

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In the application of: Konstantin Alexandrovich Shestibratov

Serial No. US No. 10/531,769

Filing date: September 5, 2010

For: METHOD FOR PRODUCING A TRANSGENIC PLANT WITH THE AID OF
AGROBACTERIUM THUMEFACIENS

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132

1. I, the undersigned, , hereby declare that I: Konstantin Alexandrovich Shestibratov
 2. am Russian citizen, resident of Moscow Region, Pushchino City, AB-23, apt. 121.
 3. graduated from Kuban State University in 1997.
 4. am employed in Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and presently hold the position of a head of laboratory.
 5. duration of my practical work experience in the field of plant biotechnology and plant molecular biology is from 1997 up to the present time. For the work in this field I have been conferred the degree of candidate of biological sciences (PhD).
 6. am a co-inventor of the invention disclosed in US Application N 10/531,769 titled "METHOD FOR PRODUCING A TRANSGENIC PLANT WITH THE AID OF AGROBACTERIUM THUMEFACIENS".
 7. have conducted experimental investigations on genetic transformation of fruit and forest plants. Findings of said investigations have demonstrated that step-by-step co-cultivation of leaf explants during *agrobacterium* mediated transformation of strawberry, apple and other plants producing transgenic plants with lower frequency of somaclonal variations and higher efficiency of genetic transformation.
- 7.1. The main results of our investigation are summarized in Table 1. Genetic transformation experiments were carried out via two protocols: a) step-by-step co-cultivation of leaf explants during *agrobacterium* mediated transformation; b) standard protocol reported by James et al. (1990) and Nehra et al. (1990). Two strawberry cultivars Feyerwerk and Selekt were used for genetic transformation experiments. Data of nine parameters listed in Table 1: number of transgenic lines, proportion of direct regenerants (transformants), efficiency of transformation, proportion of transformants with thaumatin II gene, proportion of transformants with thaumatin protein expression, accumulation level of thaumatin protein, index of resistance increment, sweetness, frequency of somaclonal variations.

Table 1. Summary of genetic transformation experiments with Feyerwerk and Selekt cultivars of strawberry.

Protocol	Cultivar	Number of transgenic lines	Proportion of direct transformants, %	Efficiency of transformation, %	Proportion of transformants with thaumatin II gene, %	Proportion of transformants with thaumatin protein expression, %	Accumulation level of thaumatin protein µg/mg total protein	Index of resistance increment	Sweetness	Frequency of somaclonal variations, %
Step-by-step protocol (A)	Feyerwerk	23	87,5	3,7	78,2	65,2	0,9	3,13	experiment - 4,15 control -3,98	30,4
	Selektia	15	93,8	8,9	86,6	86,6	1,0	3,0	experiment 4,1 control -4,0	33,3
Known method (reported by James et al (1990) and Nehra et al, 1990) (B)	Feyerwerk	10	28,3	1,0	80	70	0,8	3,0	experiment - 4,2 control -4,05	50
	Selektia	7	42,0	1,8	85,7	85,7	0,9	3,1	experiment - 4,18 control - 4,0	42,8

Principal differences were observed in such parameters as percent of direct regenerants (transformants), efficiency of transformation and frequency of somaclonal variations.

In Table 1 we demonstrate new results that were not mentioned previously. We show analysis of strawberry transgenic plants produced by James et al (1990) and Nehra et al (1990) method (number of transgenic lines, proportion of transformants with thaumatin II gene, proportion of transformants with thaumatin protein expression, accumulation level of thaumatin protein, index of resistance increment and sweetness data) as a control to compare with analysis data of transgenic plants produced by step-by-step co-cultivation method.

7.2. Using step-by-step co-cultivation method during apple leaf explants treatment we obtained increasing of GUS expression from stage A-1 to stage A-3. Maximal GUS expression was detected at stage A-3 (Fig 1). Thus, we find strong correlation with data obtained on strawberry explants.

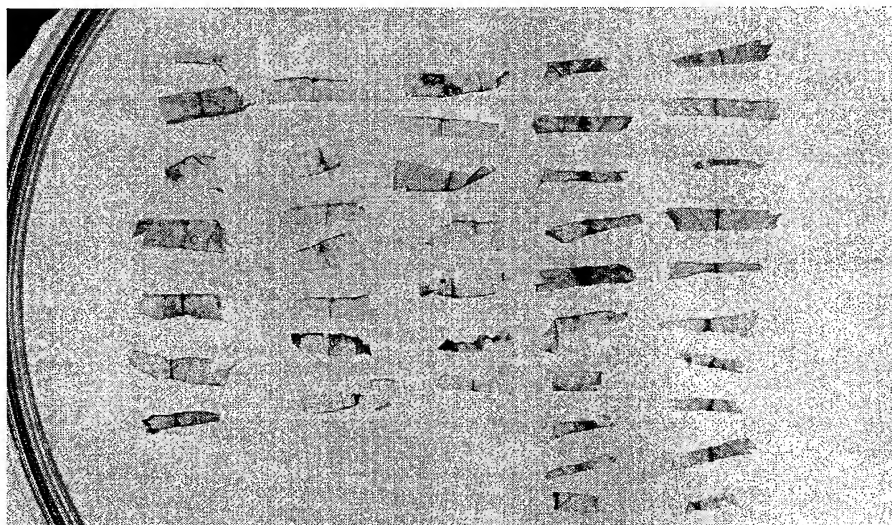


Fig 1. Influence of step-by-step co-cultivation method on GUS expression in apple leaf explants.

7.3. It is known work of Mathews et al. (1998) on strawberry genetic transformation. Due to lack of required time I was not in a position to reproduce the experiments conducted according to said reference. However, re-regeneration (several regeneration processes using transgenic starting material) on selective medium method was used by Mathews et al (1998) to eliminate chimeric plants, not to decrease frequency somaclonal variations as an undersigned property of regenerants (transformants). Moreover, frequency of somaclonal variations will be higher if re-regeneration method is used in genetic transformation process.

Dolgov et al. (1999) and Shestibratov et al. (2001) reported results of strawberry genetic transformation using protocol of James et al. (1990) and Nehra et al. (1990). Step-by-step co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* cells not used during process of transgenic plants

producing. Frequency of somaclonal variations (FSV) in transformants produced in reported investigations is about 45-60 %. Using our method FSV may be decreased to 25-30 %.

Thus, it may be concluded that our invention has the features that could not be created by a person skilled in the art basing on the results adduced in the references of Mathews et al. (1998), Dolgov et al. (1999), Shestibratov et al. (2001), said features being not a combination of those described in said publications.

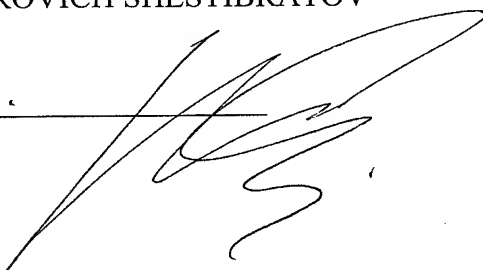
8. Field testing of strawberry and apple transgenic plants was carried out based on decision of IACGEA Committee № 5 of March 22, 2001. We also demonstrate other documents concerning field testing strawberry and apple transgenic plants (Appendix 1).

9. List of publication of inventor in the area of invention is in Appendix 2.

10. The undersigned further declares that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the above-identified application or any patent issuing thereon.

Executed on this 3- th day of September, 2010

KONSTANTIN ALEXANDROVICH SHESTIBRATOV

Владимир К. А. 

МЕЖВЕДОМСТВЕННАЯ КОМИССИЯ ПО ПРОБЛЕМАМ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА

заседания Комиссии

от "22 января" 2004 г.

№ 11

3.1. О результатах проведения полевых испытаний ГМ-растений в 2003 г. и регистрации опытных участков (И.Г.Атабеков).

Рассмотрены решения Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям

- о результатах ограниченных полевых испытаний ряда трансгенных растений (картофель, рапс, яблоня, груша, земляника садовая),
- о результатах выполнения программ испытаний на биобезопасность, рекомендованных Экспертным советом Минпромнауки России по вопросам биобезопасности (соя, кукуруза, сахарная свекла).

По результатам обсуждения постановили:

3.1.1. Принять к сведению информацию Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям о проведенных в 2003 г. ограниченных полевых испытаниях указанных трансгенных растений на зарегистрированных опытных участках: ВНИИБЗР РАСХН; ВНИИ селекции плодовых культур РАСХН, ВНИИФ РАСХН; опытном мобильном участке Центра "Биоинженерия" РАН.

3.1.2. Принять к сведению решение Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям о регистрации опытного участка Дальневосточного научно-методического центра ГНУ ДВНИИ защиты растений РАСХН (Приморский край, с.Камень-Рыболов), а также о необходимости проведения инспекции участка в ходе полевых испытаний 2004 г.

Передать протокол заседания рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям с одобрением проведенных ограниченных полевых испытаний в 2003 году, а так же с решением о регистрации опытного участка Дальневосточного научно-методического центра ГНУ ДВНИИ защиты растений РАСХН (Приморский край, с.Камень-Рыболов) на согласование в Экспертный совет Минпромнауки России по вопросам биобезопасности с целью подготовки заключения для дальнейшего его утверждения в Минпромнауки России.

3.1.3. Принять за основу разработанный рабочей группой МВКГИД по трансгенным растениям проект Регламента «Регистрация, инспекция и мониторинг опытных участков для проведения полевых испытаний ГИМР».

Рекомендовать Минпромнауки России провести согласование и утверждение проекта в установленном порядке.

Срок исполнения - 3 месяца.

Ответственный - Е.Н. Орешкин.

3.1.4. Рекомендовать Минпромнауки России разработать проект «Регламента организации проведения ограниченных полевых испытаний ГИМР на опытных участках».

Срок исполнения - 1 месяц.

Ответственный - Е.Н. Орешкин.

3.1.5. Принять к сведению информацию о результатах инспекции опытного мобильного участка Центра "Биоинженерия" РАН, о соответствии проведения полевых испытаний сортов трансгенного картофеля требованиям биобезопасности, а также о регулярности инспектирования сети опытных полевых участков для контролируемого выпуска трансгенных растений, в том числе о целесообразности инспекции в 2004г. 2-х опытных участков (с. Камень-Рыболов и г. Тамбов).

Срок исполнения - август 2004 г.


Ответственные - И.Г. Атабеков, Ю.Е. Асадова.

3.1.6. Учитывая (по опыту 2000-2003 гг.) запаздывание с высадкой трансгенных растений в грунт, изменить сроки подачи заявок на проведение ограниченных полевых испытаний в последующие годы - до 1 февраля (в текущем году - продлить срок до 1 марта).

Председатель заседания -
Первый заместитель
Председателя МВКГИД

М.П. Кирпичников

Ответственный секретарь МВКГИД

 Н.Г. Степанова

Межведомственная Комиссия по Проблемам Генно-Инженерной Деятельности

117312 Москва, пр.60-летия Октября, 7, корп. 1 (для переписки)
телефон: (095) 135-30-51; факс/телефон: (095) 135-61-85; e.mail: iacgea@biengi.ac.ru

№ 18-03/к от 10.03.2004г.

Заместителю директора ФИБХ РАН
С.А.Феофанову
Заведующему станцией «Биотрон»,
ФИБХ РАН
С.В.Долгову

С настоящим уведомляем Вас, что МВКГИД приняты на рассмотрение заявки ФИБХ РАН на проведение полевых испытаний в 2004 г. следующих трансгенных растений:

яблоня домашняя сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thau II*
яблоня клоновый подвой №545 с геном *bar*
яблоня домашняя клоновый подвой №545 с репортерным геном *gusA*
груша обыкновенная сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thau II*
груша обыкновенная клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA*
груша обыкновенная клоновый подвой ГП № 217 с геном *bar*
земляника садовая сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thau II*
земляника садовая сорт Selekt с геном суперсладкого белка *thau II*
земляника садовая сорт Selekt с репортерным геном *gusA*
яровая пшеница сорта Андрос с генами *bar, gusA, gfp*
яровая пшеница сорта Норис с генами *bar, gusA, gfp*

Сотрудник аппарата МВКГИД
И.В.Яковлева



**МЕЖВЕДОМСТВЕННАЯ КОМИССИЯ ПО ПРОБЛЕМАМ ГЕННО-
ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

117312, Москва, пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1
Тел. 135-30-51, тел/факс 135-61-85,
E-mail: IACGEA@biengi.ac.ru

От 31.03.2003 г. № 31-03/к

Зам. директора ИБХ РАН
член-кор. РАН

ЛИПКИНУ В.М.

Глубокоуважаемый В.М. Липкин!

В ответ на письмо от 31.03.2003 г. вх. № 36-03/к уведомляем Вас, что на основании Федерального Закона РФ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" от 5 июля 1996г. № 86-ФЗ, Положения о Межведомственной комиссии по генно-инженерной деятельности, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 22 апреля 1997 г. № 464 ВНИИ селекции плодовых культур РАСХН для проведения генно-инженерных работ прикреплен к комиссии по генно-инженерной деятельности ФИБХ РАН протоколом заседания МВКГИД № 5 от 22.03.2001 года.

Также сообщаем, что во ВНИИ селекции плодовых культур решением МВКГИД зарегистрирован опытный участок для проведения испытаний на биобезопасность генно-инженерно-модифицированных растений под номером 29-П/00, протокол заседания МВКГИД № 5 от 22.03.2001 года.

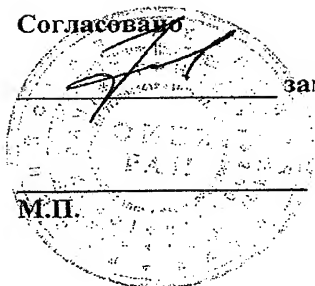
Ответственный секретарь
МВКГИД



Ю.Е. Асадова

Исп. Даниэльбек В.А. 135-61-85
e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

Согласовано



зам. директора ФИБХ РАН
С.А. Феофанов

ФИБХ РАН

В Межведомственную комиссию
по проблемам генно-инженерной деятельности

Заявка

на проведение полевых испытаний трансгенных растений

земляники садовой сорта Selekt с геном суперсладкого белка тауматина.

1. Общая информация (заявитель, авторы, собственники, контактные телефоны, адреса).

Заявитель:

Филиал Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Авторы:

К.А. Шестибратов, С.В. Долгов

Контактные телефоны:

(095) 925 23 42, факс (0967) 33 05 27

Адрес:

ФИБХ РАН, 142290 г. Пущино Московской области

2. Информация об организме - доноре ДНК, растении - реципиенте и генно-инженерно-модифицированном (трансгенном) растении.

2.1 Организм (ы) - донор (ы)

2.1.1 Тривиальное название, латинское название

Покрывосемянное растение *Thaumatococcus daniellii* Benth

2.1.2 Токсичность

Не обнаружена

2.1.3 Аллергенность

Не обнаружена

2.2 Растение реципиент

2.2.1 Тривиальное название, латинское название вида и семейства.
Таксономический статус. Дикорастущие родственные виды.

Земляника садовая (*Fragaria ananassa*), из семейства Розоцветных (*Rosaceae*).

2.2.2 Географическое распространение с/х культуры и дикорастущих
родственных видов.

С/х культура распространена повсеместно в зоне умеренного климата.

2.2.3 Возможности обмена генами с другими организмами

маловероятна

2.2.4 Генетическая стабильность генно-инженерно-модифицированного признака у трансгенных растений

Фенотипические признаки, обусловленные экспрессией перенесенного гена, стабильно проявлялись в условиях защищенного грунта в течении двух лет.

2.3 Трансгенное растение

2.3.1 Название сорта (ов)/гибрида (ов).

сорт Selekt (Evans E., Южная Африка, 1973г, PI 551873)

2.3.2 Основные сведения о ГМР:

- трансформированные линии

S-40-I: 1-6, 8, 10, 12, 14-19.

- «новое свойство»

устойчивость к фитопатогенам и улучшенный вкус

- метод введения генетической конструкции в геном растений агробактериальный метод

2.3.3 Описание генетической конструкции в геноме растения:

промотор (ы) - промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV 35S*)

- промотор нопалинсинтазы (*nos*)

ген (ы) - ген тауматина II (*thaumII*)

усилитель (и) (enhancer) - нет

терминатор (ы) - терминатор *nos* гена нопалинсинтазы

селективные маркеры - - ген неомизинфосфотрансферазы (*nptII*)

2.3.4 Токсичность

Не обнаружена

2.3.5 Аллергенность

Не обнаружена

3. Условия и цели интродукции трансгенного растения в открытую систему и описание принимающей среды

3.1 Описание полевых испытаний:

3.1.1 Цель полевых испытаний:

- Научно-исследовательские работы (тема, задача)

Оценка экспрессии гетерологичных генов в растениях земляники садовой в условиях открытого грунта. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу.

- Ограниченные полевые испытания (цель, задача)

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам.

- Испытания на биобезопасность

Оценка возможности спонтанного переноса чужеродных генов в растения нетрансгенных сортов.

3.1.2 Места проведения испытаний

Полигон для испытаний ГМО на базе Интродукционно-карантинного питомника Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

3.1.3 Планируемый период проведения эксперимента в поле (предполагаемые даты начала и завершения работ)

Предполагаемая дата начала работ - апрель-май, окончание работы - октябрь 2004 г.

3.1.4 Количество трансгенных растений/площадь посева

Не менее 10 растений на одну трансгенную линию.

3.1.5 Агрономические приемы, применяемые при выращивании трансгенных растений

При выращивании трансгенного растительного материала будут использоваться типовые агротехнические приемы, применяемые при промышленном возделывании данной культуры, а также проводиться оценка фенотипических проявлений перенесенного признака.

3.1.6 Методы удаления с поля трансгенного материала при экстренной необходимости

При возникновении экстренной ситуации предусматривается раскорчевка растений и полное уничтожение растительного материала

3.1.7 Схема посадки трансгенных растений и расположения на опытном экспериментальном участке (по согласованию заявителя с исполнителем полевых испытаний)

Система посадки трехрядная, расстояние между рядами 1 м, а между растениями в ряду 0,5 м. Ограниченная рандомизация по линиям.

4. Данные о взаимодействии трансгенного растения с окружающей средой

4.1. Свойства ГМР, влияющие на их выживание, неконтролируемое размножение

По причине практической невозможности семенного размножения садовой земляники и жестких мер предосторожности в карантинном питомнике, неконтролируемое размножение представляется маловероятным.

4.2. Взаимодействие ГМР с окружающей средой, флорой и фауной в месте выпуска

Испытуемые трансгенные растения не оказывают негативного влияния на флору и фауну, так как привнесенные гены не являются токсичными для представителей флоры и фауны в месте выпуска.

4.3. Вероятность передачи трансгенов другим организмам

Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях и возможности семенного размножения только в

искусственных условиях, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

5. Мониторинг и действия в чрезвычайных ситуациях

Полевые испытания предполагается проводить на изолированной территории огороженной металлической сеткой высотой 2,4 м. С внутренней стороны питомник окружен канавой глубиной 0,5-0,7 метра. Имеется один въезд, ворота с дезинфицирующим устройством. Оборудована санитарная яма для утилизации растительных остатков подлежащих уничтожению. Обеспечивается круглосуточная охрана территории. При возникновении экстренной ситуации предусматривается полное уничтожение растительного материала.



6. Информация о ГМР, предоставляемая для открытого доступа:

- Культура земляника садовая
- сорт (по усмотрению заявителя)
- трансформационное событие (номер)
- «новое свойство» - улучшенный вкус и повышенная устойчивость к фитопатогенам
- ген (по усмотрению заявителя)
- место выпуска (регион) - Европейская часть России
- цель полевых испытаний - изучение фенотипического проявления новых свойств в условиях открытого грунта
- год - 2004

Ответственные исполнители:

М.н.с. станции «Биотрон», ФИБХ РАН

Зав. станцией «Биотрон», ФИБХ РАН

 Шестибратов К.А.
 Долгов С.В.



директора ФИБХ РАН
Иск-корр. РАН В.М.Липкин

АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.

2. Данные об авторах ГМР.

2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация
(название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

К.А. Шестибратов, С.В. Долгов. Филиал Института биоорганической химии им. акад.
М.М.Шемакина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел
(095) 925 23 42, факс 0277 9 05 27

3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.

3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.

Название сорта (ов)

Земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.), сорт Фейерверк (селекция ВНИИГиСПР) из
семейства Розоцветных (*Rosaceae*).

3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.

- наименование трансформированной линии: Ф-40-(I-1)-1; Ф-40-I:1, 2, 5,
7-10, 12-20; Ф-40-II-3; Ф-40-VII: 1, 2.
- категория трансформированного признака: FR, PQ
- фенотип: FR, улучшенный вкус
- генно-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
- генотип:
 - промотор - 35S
 - ген - *thaumatinII*
 - усилитель (enhancer) -
 - терминатор - nos
 - селектируемые маркеры:
 - промотор - nos
 - ген - NPTII
 - терминатор - nos

4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм CBE21

5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого/
ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности.

Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пушкино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель)

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.

Рассада в возрасте 6-12 месяцев. Список прилагается.

7.4. Цель передачи

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

-Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

- масштаб интродукции

- см. приложение

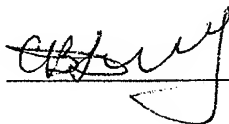
8. Я (мы) удостоверяю (ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).

Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

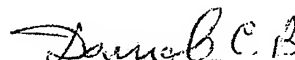
☐

☐

Подпись (и) отправителя (ей)



Фамилии



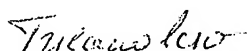
☐

Дата

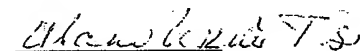
☐

☐

Подпись (и) получателя (ей)



Фамилии



Дата



Форма 2

Зам. директора ИБХ РАН
Иван-корр. РАН В.М.Липкин

**АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)**

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.

32-Р/00

2. Данные об авторах ГМР.

2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация
(название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42,
факс 02779 05 27

3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.

3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.
Название сорта (ов)

Яблоня домашняя (*Malus domestica*) сорт Мелба канадской селекции семейство
Розоцветных (*Rosaceae*).

3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.

- наименование трансформированной линии: MI 2-1,2-2
- категория трансформированного признака: FR, PQ
- фенотип: FR, улучшенный вкус
- генно-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
- генотип:

промотор - 35S
ген - *thaumatinII*
усилитель (enhancer) -
терминатор - nos
селектируемые маркеры:
промотор - nos
ген - NPTII
терминатор - nos

4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм СВЕ21

5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого/
ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности. Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях и отсутствия семенного размножения, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель).

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.

Однолетние саженцы (список прилагается)

7.4. Цель передачи

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

-Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

- масштаб интродукции

- см. приложение

8. Я (мы) удостоверяю(ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).

Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

☐

☐

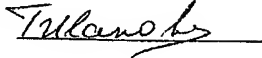
Подпись (и) отправителя (ей)  Фамилии С.В.Долгов

☐

Дата 31.08.00

☐

☐

Подпись (и) получателя (ей)  Фамилии Т.Д.Ивановский

Дата _____



Форма 2

директора ИБОХ РАН
член-корр. РАН В.М.Липкин

**АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)**

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.

33-Р/00

2. Данные об авторах ГМР.

2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация
(название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

В.Г. Лебедев С.В. Долгов. Филиал Института биорганической химии им. акад.
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел
(095) 925 23 42, факс 02779 05 27

3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.

3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.
Название сорта (ов)

Груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.) сорта Бураковка (белорусская народная
селекция) из семейства Розоцветных (*Rosacea*)

3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.

- наименование трансформированной линии: MI 2-1,2-2
- категория трансформированного признака: FR, PQ
- фенотип: FR, улучшенный вкус
- генно-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
- генотип:

промотор - 35S
ген - thaumatinII
усилитель (enhancer) -
терминатор - nos
селектируемые маркеры:
промотор - nos
ген - NPTII
терминатор - nos

4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм СВЕ21

5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого/
ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности. Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях и отсутствия семенного размножения, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель).

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.

Однолетние саженцы, список прилагается

7.4. Цель передачи

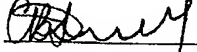
Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

-Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

- масштаб интродукции

8. Я (мы) удостоверяю(ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).
Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

Подпись (и) отправителя (ей)  Фамилии С.В.Долгов

Дата 31.05.00

Подпись (и) получателя (ей)  Фамилии Т.Д. Ивановский

Дата _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Зам. директора ИБХ РАН

Член кор. РАН

В.М.Липкин

2002 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши, земляники и хризантемы, полученных на станции искусственного климата «Биотрон», на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2002 году

В течение 2002 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- клоновый подвой № 545 с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 34-P/00)
- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 32-P/00)
- клоновый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00)
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. №)

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 35-P/00)
- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 33-P/00)
- клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptII* или *hpt* (рег. №)
- клоновый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00)

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.)

- сорт Фейерверк с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 42-P/00)
- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. №)

г) хризантема садовая (*Dendrathera morifolium*.Ramat)

- сорт White Snowdon с геном изменения качества продукции *rolC* и селективным геном *nptII* (рег. №)

В течение 2002 года проводились следующие испытания трансгенных растений:

1. Анализ трансгенных растений на предмет возможных отклонений по своим морфологическим параметрам от контрольных нетрансгенных растений.

Полевые испытания 18 линий земляники с геном *thaumatinII* на предмет соответствия сортотипу показали, что только 11 линий по основным показателям вегетативной и генеративной активностей соответствуют сорту Фейерверк. 7 линий по ряду показателей, а именно: высоте куста, количеству цветоносов, урожайности и форме плодов, отличались от контрольных растений. Не было выявлено отклонений от контрольных растений для клонов земляники с геном редечного дефензина, а также для трансгенных клонов яблони и груши. Трансгенные растения хризантемы с геном *rolC* характеризовались проявлением ряда фенотипических изменений, типичных для экспрессии встроенного гена изменения габитуса, а именно: редуцированным ростом, укороченными междоузлиями и повышенной рассеченностью листовой пластинки.

2. Оценка экспрессии суперсладкого белка.

Функциональность интродуцированного гена суперсладкого белка *thaumatin II* в трансгенных растениях яблони, груши и земляники анализировалась методом Вестерн-блот гибридизации. Анализу подвергались листья и плоды земляники, а также листья яблони и груши. Было установлено, что белок синтезируется в 15 из 18 линий земляники, содержащих чужеродный ген, а также во всех 2 линиях яблони и 3 линиях груши.

3. Оценка устойчивости к гербициду трансгенных растений яблони и груши.

Устойчивость клоновых подвоев яблони и груши, содержащих ген устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar*, была оценена обработкой этих растений водным раствором гербицида "Basta". Опрыскивание проводили 1% раствором гербицида в дозе, эквивалентной 20 л/га для растений груши и 10 и 20 л/га для растений яблони. Стандартная

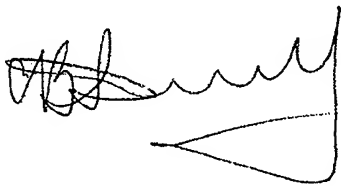
полевая доза составляет 3-5 л/га. Было установлено, что трансгенные растения обладают высокой степенью устойчивости к обработке гербицидом.

4. Оценка возможности вертикального переноса чужеродного гена в нетрансгенные дикорастущие растения близкородственных видов.

Изучение возможности перекрестного опыления трансгенных растений с дикими сородичами (земляники лесной *Fragaria vesca*) пыльцой трансгенных растений *Fragaria ananassa*, содержащих ген nptII, показало, что при культивировании трансгенных и нетрансгенных растений в непосредственной близости друг от друга (0,5 -1 м) под общим защитным пологом, предотвращающим распространение пыльцы, переопыление происходит. Частота переопыления, при пересчете на ягоды варьировала от 25 до 75 %.

По окончании вегетационного сезона 2002 года насаждения трансгенных растений с геном растительного дефензина в количестве 86 растений яблони и 167 растений груши были раскорчеваны и утилизированы с соблюдением всех норм безопасности по работе с трансгенным биологическим материалом.

Ответственный исполнитель
зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.



С.В.Долгов



«УТВЕРЖДАЮ»

директора ФИБХ РАН

С.А.Феофанов

» _____ 2003 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши и земляники, полученных на станции искусственного климата «Биотрон», на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2003 году

В течение 2003 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 32-P/00)
- клоновый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00)
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. № 47-P/00)

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 33-P/00)
- клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptII* или *hpt* (рег. № 48-P/00)
- клоновый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00)

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.)

- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 45-P/00)
- сорт Фейерверк с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. №

В течение 2003 года проводились следующие испытания трансгенных растений:

1. Анализ трансгенных растений на предмет возможных отклонений по своим морфологическим параметрам от контрольных нетрансгенных растений.

11 линий отобранных по результатам полевых испытаний 2002 года, повторно анализировались на предмет соответствия исходному сорто типу, но уже после одного акта вегетативного размножения усами. Среди них было обнаружено две линии с незначительными отклонениями в морфологии плодов, а именно форме и окраске. По результатам данных испытаний из 18 линий, допущенных к испытаниям, выделено 9 без отклонений в фенотипе.

Не было выявлено отклонений от контрольных растений для трансгенных клонов яблони и груши.

2. Оценка экспрессии репортерного гена *gusA*.

Количественный анализ экспрессии гена *gusA* проводили флуориметрическим методом. Анализировали листовую ткань 19 трансгенных линий подвоя груши. Анализ показал трехкратное превышение активности фермента в растениях, содержащих конструкцию гена с интроном.

3. Оценка экспрессии суперсладкого белка.

Функциональность интродуцированного гена суперсладкого белка *thaumatin II* в трансгенных растениях яблони, груши и земляники анализировалась методом Вестерн-блот гибридизации. Анализу подвергались плоды земляники с растений претерпевших один акт вегетативного размножения усами, а также листья яблони и груши. У 11 отобранных линий земляники без соматоклональных изменений, картина экспрессии тауматина осталась без изменений, что уже позволяет говорить о стабильном функционировании гена тауматина. Аналогичные данные получены при анализе экспрессии тауматиан во всех 2 линиях яблони и 3 линиях груши.

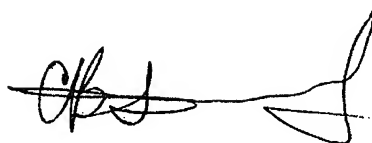
4. Оценка возможности вертикального переноса чужеродного гена в нетрансгенные дикорастущие растения близкородственных видов.

Анализ семян из плодов земляники лесной *Fragaria vesca*, культивируемой под общим защитным пологом с трансгенными растениями земляники садовой содержащими гены *thauII* и *gusA*, показал, что частота переопыления при пересчете на ягоды варьировала от 25

до 75 %, как и в случае с геном prtII . Растения дикого родича, растущие вне защитного полога, но в непосредственной близости от трансгенных растений не претерпели переопыления.

Ответственный исполнитель

зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.



С.В.Долгов

«УТВЕРЖДАЮ»



Зам. директора ИБХ РАН

Член-корр. РАН

В.М.Липкин

» _____ 2001 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши и земляники, полученных на станции искусственного климата «Биотрон» на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2000 году

В течение 2000 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- клоновый подвой № 545 с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 34-P/00), 26 клонов – 89 шт
- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 32-P/00), 2 клона – 21 шт
- клоновый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00), 1 клон – 8 шт
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. № _____), 12 клонов – 12 шт
- клоновый подвой № 545 нетрансформированный – 12 шт

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 35-P/00), 65 клонов – 167 шт
- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 33-P/00), 4 клона – 25 шт
- клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptII* или *hpt* (рег. № _____), 19 клонов – 49 шт
- клоновый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00), 17 клонов

- сорт Бураковка нетрансформированный – 5 шт
- клоновый подвой ГП № 217 нетрансформированный – 6 шт

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.)

- сорт Фейерверк с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 42-P/00), 6 клонов – 43 шт
- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. №), 20 клонов – 154 шт
- сорт Фейерверк нетрансформированный – 10 шт

г) хризантема садовая (*Dendrathera morifolium*.Ramat)

- сорт White Snowdon с геном изменения качества продукции *rolC* и селективным геном *nptII* (рег. №), 1 клон – шт

Посадка яблони проведена одно-, дву- и трехлетними саженцами, груши – одно- и двулетними саженцами, земляники – однолетними растениями, хризантемы – укорененными зелеными черенками.

Проведена оценка морфологических свойств трансгенных растений. Отклонений от контрольных растений не выявлено.

Проведена апробация высаженных растений на предмет соответствия сортовым признакам.

Также был проведен гистохимический и флуориметрический анализ листовой ткани на экспрессию гена *gusA*.

Проводили органолептический анализ листовой ткани растений с геном суперсладкого белка.

После окончания вегетационного сезона провели измерения количественных параметров: высоты растений, диаметра штамба, количества и длины ветвей.

В конце сезона произведен отбор проб почвы с различной глубины с целью определения возможности горизонтального переноса чужеродных генов из генетически модифицированных растений в почвенную микрофлору.

Также осуществлено вегетативное размножение трансгенных и контрольных растений земляники с помощью розеток.

Ответственный исполнитель
зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.

 С.В.Долгов

Список публикаций авторов по теме изобретения

1. Шестибратов К.А., Таран С.А., Лунин В.Г., Шматченко В.В., Пискарева О.А., Долгов С.В. (2000). Молекулярная селекция земляники садовой на повышение устойчивости к фитопатогенам и изменение вкуса плодов путем интродукции генов растительного дефензина RS-AFP2 и суперсладкого белка тауматин II. / Тезисы докладов V чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова "Биоорганика", 13-20 ноября 2000, ИБХ-ФИБХ, Москва-Пушино.
2. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Долгов С.В. (2001) Эффективность коинтеграции гетерологичных последовательностей ДНК из Т-областей различных агробактериальных репликонов в ядерный геном растений. / Тезисы докладов Отчетной конференции Филиала Института биоорганической химии РАН, 22-23 ноября 2001 года, Пушино.
3. Долгов С.В., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Митюшкина Т.Ю. (2002) Полевые испытания трансгенных садовых культур: проблемы и перспективы. / Тезисы докладов VI чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова, 25 ноября – 2 декабря 2002, ИБХ-ФИБХ, Москва-Пушино.
4. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. (2002) Полевые испытания трансгенных плодовых и ягодных культур. / Информационный бюллетень Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности, N 3, 2002.
5. Шестибратов К.А., Долгов С.В. (2005) Способ получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенам. / Патент РФ N 2261275, приоритет от 24 октября 2002 г.
6. Шестибратов К.А., Корнеева И.В., Харченко П.Н., Долгов С.В. (2005) Экспрессия гетерологичных PR-5 белков и повышение устойчивости растений к фитопатогенам. Тезисы докладов Третьего Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 14-16 Марта, 2005.
7. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Булатова И.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2005) Повышение устойчивости растений к патогенам путем гетерологичной экспрессии нативных и модифицированных pr-5 генов. // Материалы 2-й международной конференции «Наука – Бизнес – Образование, Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда», Пушино, 11-13 мая 2005.
8. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Овчинникова Е.В., Булатова И.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2005) Семейство генов тауматин-подобных белков – как перспективная группа в повышении устойчивости растений к фитопатогенам путем растительного трансгеноза. Материалы VI

- Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», Звенигород, 12-16 декабря 2005.
9. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Михайлов Р.В., Ивановский Г.Д., Харченко П.Н., Долгов С.В. (2005) Генно-инженерные методы в селекции плодовых и ягодных культур. Сборник научных трудов «Плодоводство и ягодоводство России». – Москва: Изд-во ВСТИСП, 2005. – Т.ХП. – С.348-357.
 10. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Овчинникова Е.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2006) Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка thaumatin II в апопласте трансгенных растений табака. Материалы Третьей международной конференции из серии "Наука и бизнес": Международное сотрудничество в биотехнологии: Ожидания и реальность. 19 - 21 июня 2006 г., Пушкино.
 11. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. (2008) Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы. Биотехнология. № 5, С.3-22.
 12. Тимербаев В.Р., Шестибратов К.А., С.В.Долгов (2008) Клонирование и функциональный анализ трех форм промотора полигалактуроназы томата. Биотехнология. № 6, С.23-30.
 13. Шестибратов К.А., Булатова И.В., Новиков П.С. (2009) Реакция трансгенных растений осины с геном глутаминсинтетазы GS1 на сублетальную дозу фосфинотрицина в условиях *in vitro*. Биотехнология, № 6, С 49-56.
 14. В.Г.Лебедев, К.А.Шестибратов*, Т.Е.Шадрина, И.В.Булатова, Д.Г.Абрамочкин, А.И.Мирошников (2010) Ко-трансформация осины и березы тремя областями т-днк, находящимися на двух различных репликалах в одном штамме *Agrobacterium tumefaciens*. Генетика, № 10 (in press).
 15. Dolgov S.V., Miroshnichenko D.N., Shestibratov K.A. (2000) *Agrobacterial transformation of apple cultivar and rootstock. Acta Horticulturae*, N 538, V 2, pp 619-625.
 16. Schestibratov K, Lebedev V and Dolgov S (2001) Different effects of intron on gus expression in dicot and conifer woody plants. / in Abstracts of The International scientific congress "Tree biotechnology: in the next Millennium" Stevenson, Washington, July 22-27, 2001.
 17. Schestibratov K and Dolgov S (2001) Genetic engineering of strawberry cv. Firework. / in Abstracts of 43rd ETCS Congress, Granada, Spain, September 30-October 3, 2001.
 18. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of *thauII* and *rs-afp3* genes./ in Abstracts of Agricultural Biotechnology International Conference, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 15-18 September, 2002.
 19. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of *thauII* and *rs-afp3* genes. / in Abstracts of 1st EPSO Conference: Networks in Plant Biology, Brunnen, Switzerland, 27-31 October, 2002.

20. Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci. Hort.* V 106(2): 177-189.
21. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and cell localization of a PR-5 protein with different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants. *Revue de Cytologie et Biologie Végétales* 28: 260-267.
22. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and inheritance of transgenes in tomato plants transformed by a plant PR-5 protein gene. *ESNA XXXV Annual Meeting. Abstracts.* – Amiens, 29 August-2 September 2005.
23. Schestibratov, K.A., Dolgov, S.V. 2006. Genetic engineering of strawberry cv. Firework and cv. Selekt for taste improvement and enhanced disease resistance by introduction of *thauii* gene. *Acta Hort. (ISHS)* 708:475-482.
24. Schestibratov K.A., Pushin A.S., Ovchinnikova E.V., Chang A., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2006) Apoplastic expression of the chimeric gene encoding the recombinant precursor of thaumatin II protein in transgenic tobacco plants. Abstracts of 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2006 Sustainable disease management: the European perspective. Frederiksberg, Denmark, August 13-17, 2006.
25. Schestibratov KA, Pushin AS, Bulatova IV, Firsov AP, Dolgov SV (2006) Thaumatin-like proteins: antifungal activity, heterologous expression and transgenic plant production. Abstracts of Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance Symposium in memoriam Zoltán Klement (1926-2005), Budapest, Hungary, August 31 – September 3, 2006.

**INTERDEPARTMENTAL COMMISSION ON PROBLEMS OF GENETIC
ENGINEERING ACTIVITIES**

Record of Proceedings of the Commission Session

January 22, 2004

No. 11

3.1. On results of the field tests of GM plants in 2003 and registration of trial plots

(I.G. Atabekov)

On the agenda there were put the resolutions of the Commission working group:

- about results of restrained field tests of a series of transgenic plants (potato, rape, apple tree, pear, garden strawberry),
- about results of accomplishment of the biological safety test programs recommended by the Council of Experts of the Ministry of Science and Technology of the Russian Federation (soya, corn, sugar beet).

In accordance with results of the discussion there was adopted the following resolution

3.1.1. To approve the information provided by the Commission working group about restrained field tests performed in 2003 in the above-mentioned transgenic plants on the registered trial plots of : All-Russian Research Institute of Biological Protection of Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences (VNIIBZR RASKhN); All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences; All-Russian Research Institute of Phytopathology, Russian Academy of Agricultural Sciences (VNIIF, RASKhN); and on a mobile trial plot of the Bioinzheneria Center, Russian Academy of Sciences.

3.1.2. To approve the resolution of the Commission working group about registration of a trial plot of the Far-Eastern Scientific Guidance Center of the State Scientific Institution: Far-Eastern Research Institute of Plant Protection (GNU DVNII of Plant Protection RASKhN), (Primorskii Region, Kamen-Rybolov), and the necessity of inspection of the plot during the field tests in 2004.

To submit to the Council of Experts on problems of biological safety of the Ministry of Science and Technology of the Russian Federation the record of proceedings of the session of the Commission working group with resolutions about approval of carrying out the restrained field tests in 2003 and registration of the Far-Eastern Scientific Guidance Center of GNU DVNII of Plant Protection RASKhN (Primorskii Region, Kamen-Rybolov) to formulate the Decision for further approval thereto in the Ministry of Science and Technology of the Russian Federation.

3.1.3. To accept basically a draft of Regulations for “Registration, inspection, and monitoring of trial plots for carrying out field tests of GM plants” prepared by the Commission working group.

To apply to the Ministry of Science and Technology of the Russian Federation for approval and authorization of the draft as it is provided by the appropriate procedure.

Term of fulfillment: 3 months

Responsible official: E.N. Oreshkin

3.1.4. To apply to the Ministry of Science and Technology of the Russian Federation to work out a draft of “Regulations for organization of carrying out restrained field tests of GM plants on trial plots”.

Term of fulfillment: 3 months

Responsible official: E.N. Oreshkin

3.1.5. To approve the information about results of the inspection of the mobile trial plot of the Bioinzheneria Center RAN, compliance of the performed field tests of transgenic potato varieties with the requirements of biological safety, and regularity of inspecting a network of

field trial plots for a controlled output of transgenic plants and expediency of inspecting in 2004 of two trial tests (Kamen-Rybolov and Tambov city).

Term of fulfillment: 3 months

Responsible officials: I.G. Atabekov and Yu.E. Asadova

3.1.6. In consideration of a delay (by experience of 2000-2003) in planting transgenic seedlings into soil, to change the terms for filing applications for fulfillment of restrained field tests: till February 1 in the coming years and to extend the term this year till March 1.

Chair

M.P. Kirpichnikov,

First Deputy Chairman of Commission

Executive Secretary

N.G. Stepanova

МЕЖВЕДОМСТВЕННАЯ КОМИССИЯ ПО ПРОБЛЕМАМ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА заседания Комиссии

от "22 января" 2004 г.

№ 11

3.1. О результатах проведения полевых испытаний ГМ-растений в 2003 г. и регистрации опытных участков (И.Г.Атабеков).

Рассмотрены решения Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям

- о результатах ограниченных полевых испытаний ряда трансгенных растений (картофель, рапс, яблоня, груша, земляника садовая),

- о результатах выполнения программ испытаний на биобезопасность, рекомендованных Экспертным советом Минпромнауки России по вопросам биобезопасности (соя, кукуруза, сахарная свекла).

По результатам обсуждения постановили:

3.1.1. Принять к сведению информацию Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям о проведенных в 2003 г. ограниченных полевых испытаниях указанных трансгенных растений на зарегистрированных опытных участках: ВНИИБЗР РАСХН; ВНИИ селекции плодовых культур РАСХН, ВНИИФ РАСХН; опытном мобильном участке Центра "Биоинженерия" РАН.

3.1.2. Принять к сведению решение Рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям о регистрации опытного участка Дальневосточного научно-методического центра ГНУ ДВНИИ защиты растений РАСХН (Приморский край, с.Камень-Рыболов), а также о необходимости проведения инспекции участка в ходе полевых испытаний 2004 г.

Передать протокол заседания рабочей группы МВКГИД по трансгенным растениям с одобрением проведенных ограниченных полевых испытаний в 2003 году, а также с решением о регистрации опытного участка Дальневосточного научно-методического центра ГНУ ДВНИИ защиты растений РАСХН (Приморский край, с.Камень-Рыболов) на согласование в Экспертный совет Минпромнауки России по вопросам биобезопасности с целью подготовки заключения для дальнейшего его утверждения в Минпромнауки России.

3.1.3. Принять за основу разработанный рабочей группой МВКГИД по трансгенным растениям проект Регламента «Регистрация, инспекция и мониторинг опытных участков для проведения полевых испытаний ГИМР».

Рекомендовать Минпромнауки России провести согласование и утверждение проекта в установленном порядке.

Срок исполнения - 3 месяца.

Ответственный - Е.Н. Орешкин.

3.1.4. Рекомендовать Минпромнауки России разработать проект «Регламента организации проведения ограниченных полевых испытаний ГИМР на опытных участках».

Срок исполнения - 1 месяц.

Ответственный - Е.Н. Орешкин.

3.1.5. Принять к сведению информацию о результатах инспекции опытного мобильного участка Центра "Биоинженерия" РАН, о соответствии проведения полевых испытаний сортов трансгенного картофеля требованиям биобезопасности, а также о регулярности инспектирования сети опытных полевых участков для контролируемого выпуска трансгенных растений, в том числе о целесообразности инспекции в 2004г. 2-х опытных участков (с. Камень-Рыболов и г. Тамбов).

Срок исполнения - август 2004 г.

Ответственные - И.Г. Атабеков, Ю.Е. Асадова.

3.1.6. Учитывая (по опыту 2000-2003 гг.) запаздывание с высадкой трансгенных растений в грунт, изменить сроки подачи заявок на проведение ограниченных полевых испытаний в последующие годы - до 1 февраля (в текущем году - продлить срок до 1 марта).

Председатель заседания -
Первый заместитель
Председателя МВКГИД

М. П. Кирпичников

Ответственный секретарь МВКГИД

Н. Г. Степанова

**INTERDEPARTMENTAL COMMISSION ON PROBLEMS OF GENETIC
ENGINEERING ACTIVITIES**

No. 13-03/K of 10.03.2004

S.A. Feofanov
Deputy Director
FIBKh RAN

S.V. Dolgov
Head of
Biotron station

This is to advise that the Commission has accepted for consideration the applications from the FIBKh for field tests of the following transgenic plants:

cultivated apple, Melba variety with a *thau II* gene of supersweet protein

apple, clonal stock N 545 with a *bar* gene

cultivated apple, clonal stock N 545 with a reporter *gusA* gene

common pear, Burakovka variety with a *thau II* gene of supersweet protein

common pear, clonal stock GP N 217 with a reporter *gusA* gene

common pear, clonal stock GP N 217 with a *bar* gene

garden strawberry, Feyerwerk variety with a *thau II* gene of supersweet protein

garden strawberry, Selekt variety with a *thau II* gene of supersweet protein

garden strawberry, Selekt variety with a reporter *gusA* gene

spring wheat, Andros variety with *bar*, *gus A*, and *gfp* genes

spring wheat, Noris variety with *bar*, *gus A*, and *gfp* genes

I.V. Yakovleva
Executive

Межведомственная Комиссия по Проблемам Генно-Инженерной Деятельности

117312 Москва, пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1 (для переписки)
телефон: (095) 135-30-51; факс/телефон: (095) 135-61-85; e.mail: iacgea@biengi.ac.ru

№ 13-03/к от 10.03.2004г.

Заместителю директора ФИБХ РАН
С.А.Феофанову
Заведующему станцией «Биотрон»,
ФИБХ РАН
С.В.Долгову

С настоящим уведомляем Вас, что МВКГИД приняты на рассмотрение заявки ФИБХ РАН на проведение полевых испытаний в 2004 г. следующих трансгенных растений:

яблоня домашняя сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thau II*
яблоня клоновый подвой №545 с геном *bar*
яблоня домашняя клоновый подвой №545 с репортерным геном *gusA*
груша обыкновенная сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thau II*
груша обыкновенная клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA*
груша обыкновенная клоновый подвой ГП № 217 с геном *bar*
земляника садовая сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thau II*
земляника садовая сорт Selekt с геном суперсладкого белка *thau II*
земляника садовая сорт Selekt с репортерным геном *gusA*
яровая пшеница сорта Андрос с генами *bar, gusA, gfp*
яровая пшеница сорта Норис с генами *bar, gusA, gfp*

Сотрудник аппарата МВКГИД
И.В.Яковлева



**INTERDEPARTMENTAL COMMISSION ON PROBLEMS OF GENETIC
ENGINEERING ACTIVITIES**

N 31-03/k of 31.03.2003

V.M. Lipkin
Deputy Director
IBKh RAN

Dear Mr. Lipkin,

In response to the letter of 31.03.2003, our ref. no. 36-03/k, please be advised that in compliance with the RF Federal Law N 86-FZ "On the government control in the field of genetic engineering activities" as of July 5, 1996 and the Commission resolution authorized by the RF Government decree N 464 as of April 22, 1997, the Research Institute of Selection of Fruit Plants of the Russian Academy of Agriculture has been affiliated with the commission on genetic engineering of the IBKh RAN for the purpose of conducting work on genetic engineering in accordance with the Protocol N 5 of the Commission session as of 22.03.2001.

Yu.E. Asadova
Executive Secretary

МЕЖВЕДОМСТВЕННАЯ КОМИССИЯ ПО ПРОБЛЕМАМ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

117312, Москва, пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1

Тел. 135-30-51, тел/факс 135-61-85,

E-mail: IACGEA@biengi.ac.ru

От 31.03.2003 г. № 31-03/к

Зам. директора ИБХ РАН
член-кор. РАН

ЛИПКИНУ В.М.

Глубокоуважаемый В.М. Липкин!

В ответ на письмо от 31.03.2003 г. вх. № 36-03/к уведомляем Вас, что на основании Федерального Закона РФ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" от 5 июля 1996г. № 86-ФЗ, Положения о Межведомственной комиссии по генно-инженерной деятельности, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 22 апреля 1997 г. № 464 ВНИИ селекции плодовых культур РАСХН для проведения генно-инженерных работ прикреплен к комиссии по генно-инженерной деятельности ФИБХ РАН протоколом заседания МВКГИД № 5 от 22.03.2001 года.

Также сообщаем, что во ВНИИ селекции плодовых культур решением МВКГИД зарегистрирован опытный участок для проведения испытаний на биобезопасность генно-инженерно-модифицированных растений под номером 29-П/00, протокол заседания МВКГИД № 5 от 22.03.2001 года.

Ответственный секретарь
МВКГИД



Ю.Е. Асадова

Approved

S.A. Feofanov

Signature

Deputy Director

FIBKh RAN

Stamp

TO: Interdepartmental Commission on Problems
of Genetic Engineering Activities

APPLICATION

for conducting field tests of transgenic plants

garden strawberry, Selekt variety with a *thamatin II* gene of supersweet protein

1. General information (applicant, authors, owners, telephone numbers, addresses)

Applicant

Affiliated Branch of the Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

Authors

K.A. Shestibratov and S.V. Dolgov

Telephone numbers

(095) 925 23 42; FAX (0967) 33 05 27

Address

FIBKh RAN, 142290, Pushchino, Moscow Region

2. Information about the organism – DNA donor, plant-recipient, and genetically modified (transgenic) plant

2.1. Organism(s) – DNA donor(s)

2.1.1. English name

Latin name

Angiosperm plant

Thaumatococcus daniellii Benth

2.1.2. Toxicity

Not observed

2.1.3 Allergenicity

Not observed

2.2. Plant-recipient

2.2.1. English name, Latin name of species and family. Taxonomic status. Wild allied species.

Garden strawberry (*Fragaria ananassa*), Rosales order family (*Rosaceae*).

2.2.2. Geographic areas of cultivars and wild allied species

The cultivar is widely spread in the zone of temperature climate.

2.2.3. Probability of gene exchange with other organisms is little.

2.2.4. Genetic stability of a genetically modified character of transgenic plants

Phenotypic signs associated with the expression of a foreign gene were stably observed for two years under conditions of protected soil.

2.3. Transgenic plant

2.3.1. Species name(s)/hybrid(s)

Selekta (Evans E., South Africa, 1973, PI 551873)

2.3.2. General information about the GM plant

- transformed lines

S-40-I: 1-6, 8, 10, 12, 14-19

- “new property”

resistance to phytopathogens and improved taste

- method of introduction of genetic material into a plant genome

an agrobacterial method

2.3.3. Description of a genetic material in a plant genome:

promoter(s) – promoter of a cauliflower mosaic virus (*CaMV 35S*)

promoter of nopaline syntase (*nos*)

gene(s) thaumatin II gene (*thauII*)

enhancer(s) none

terminator(s) terminator of nopaline syntase *nos* gene

selective markers neomycinphosphotransferase gene (*nptII*)

2.3.4. Toxicity

Not observed

2.3.5. Allergenicity

Not observed

3. Conditions and purposes of introduction of a transgenic plant into open system and description of the accepting medium

3.1. Description of the field tests:

3.1.1. Purpose of field tests:

Research (theme, task)

Assessment of the expression of heterologous genes in garden strawberry plants under conditions of open soil. Assessment of phenotypic correlation of transgenic plants with the initial genotype

Restrained field tests (purpose, task)

Verification of the level of the phenotypic effect of a foreign gene on consumer products quality and resistance of plants to phytopathogens

Tests for biological safety

Assessment of the probability of a spontaneous transport of foreign genes into non-transgenic plants.

3.1.2. Places of field tests

A polygon for testing genetically modified objects in the facility of the introduction-quarantine botanical garden of the All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants (Orel City, p/o Zhilino).

3.1.3. Anticipated period of the field experiment (dates of commencement and completion of the work)

The anticipated date of the work commencement: April-May; completion, October 2004.

3.1.4. The number of transgenic plants/sowing area.

At least 10 plants per one transgenic line

3.1.5. Agronomic methods used in growing transgenic plants.

In growing the transgenic material, there will be used standard agricultural methods of commercial cultivation of particular plants and assessment of phenotypic signs of a transferred feature.

3.1.6. Methods of removing a transgenic material from the field in unforeseen circumstances.

In case of an unforeseen circumstance, there is provided stubbing the plants and complete destruction of the plant material.

3.1.7. Scheme of allocation of transgenic plants and arrangement of the experimental plot (as agreed between the applicant and the field testers).

A three-row system of planting at a distance of 1m between rows and 0.5 m between plants in a row. A limited randomization in lines.

4. Data on interaction of a transgenic plant with the environment.

4.1. Properties of a GM plant that influence their survival and uncontrolled reproduction.

Due to an almost impossibility of garden strawberry seeding and the strict safety measures taken in the quarantine plot, an uncontrolled reproduction is hardly possible.

4.2. Interaction of GM plants with the environment, flora, and fauna in the place of yield.

Transgenic plants under study produce no adverse effect on the flora and fauna, since the transferred genes are not toxic for the representatives of flora and fauna in the place of yield.

4.3. Probability of transport of transgenes to other organisms.

There is a probability of cross-pollination with cultivated plants, however because of the use of fruit for consumer purposes and the feasibility of reproduction by seeding only under simulated conditions, imparting the acquired features to wild plants does not seem possible.

5. Monitoring and actions in emergencies.

The field tests are supposed to be carried out on an isolated territory enclosed with a metallic net 2.4 m in height. In the interior, the plot is surrounded with a trench 0.5-0.7 m in depth. There is one entrance and a gate equipped with a disinfecting device. There is provided a sanitary pit for utilization of plant debris to be disposed of. There is provided round-the clock safeguarding the territory. In case of an unforeseen circumstance, a complete elimination of the plant material is provided.

6. Information about GM plants for public access:

- cultivated garden strawberry plant
- variety (at the applicant's discretion)
- transformation event (number)
- "new property": improved taste and enhanced resistance to phytopathogens
- gene (at the applicant's discretion)
- place of yield (region): the European area of Russia
- aim of the field tests: investigation of phenotypic manifestation of new properties under conditions of open soil
- year: 2004

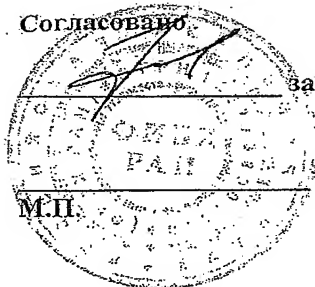
Responsible executives:

K.A. Shestibratov, Junior Researcher
Biotron Station, FIBKh RAN

S.V. Dolgov, Director
Biotron Station, FIBKh RAN

Форма 1

Согласовано



зам. директора ФИБХ РАН

С.А. Феофанов

ФИБХ РАН

М.П.

В Межведомственную комиссию
по проблемам генно-инженерной деятельности

Заявка

на проведение полевых испытаний трансгенных растений

земляники садовой сорта Selekt с геном суперсладкого белка тауматина.

1. Общая информация (заявитель, авторы, собственники, контактные телефоны, адреса).

Заявитель:

Филиал Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Авторы:

К.А. Шестибратов, С.В. Долгов

Контактные телефоны:

(095) 925 23 42, факс (0967) 33 05 27

Адрес:

ФИБХ РАН, 142290 г. Пущино Московской области

2. Информация об организме - доноре ДНК, растении - реципиенте и генно-инженерно-модифицированном (трансгенном) растении.

2.1 Организм (ы) - донор (ы)

2.1.1 Тривиальное название, латинское название

Покрытосемянное растение *Thaumatococcus daniellii* Benth

2.1.2 Токсичность

Не обнаружена

2.1.3 Аллергенность

Не обнаружена

2.2 Растение реципиент

2.2.1 Тривиальное название, латинское название вида и семейства.

Таксономический статус. Дикорастущие родственные виды.

Земляника садовая (*Fragaria ananassa*), из семейства Розоцветных (*Rosaceae*).

2.2.2 Географическое распространение с/х культуры и дикорастущих родственных видов.

С/х культура распространена повсеместно в зоне умеренного климата.

2.2.3 Возможности обмена генами с другими организмами

маловероятна

2.2.4 Генетическая стабильность генно-инженерно-модифицированного признака у трансгенных растений

Фенотипические признаки, обусловленные экспрессией перенесенного гена, стабильно проявлялись в условиях защищенного грунта в течении двух лет.

2.3 Трансгенное растение

2.3.1 Название сорта (ов) /гибрида (ов) .

сорт Selektа (Evans E., Южная Африка, 1973г, PI 551873)

2.3.2 Основные сведения о ГМР:

- трансформированные линии

S-40-I: 1-6, 8, 10, 12, 14-19.

- «новое свойство»

устойчивость к фитопатогенам и улучшенный вкус

- метод введения генетической конструкции в геном растений агробактериальный метод

2.3.3 Описание генетической конструкции в геноме растения:

промотор (ы) - промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV 35S*)

- промотор нопалинсинтазы (*nos*)

ген (ы) - ген тауматина II (*thaII*)

усилитель (и) (*enhancer*) - нет

терминатор (ы) - терминатор *nos* гена нопалинсинтазы

селективные маркеры - - ген неомифосфотрансферазы (*nptII*)

2.3.4 Токсичность

Не обнаружена

2.3.5 Аллергенность

Не обнаружена

3. Условия и цели интродукции трансгенного растения в открытую систему и описание принимающей среды

3.1 Описание полевых испытаний:

3.1.1 Цель полевых испытаний:

- Научно-исследовательские работы (тема, задача)

Оценка экспрессии гетерологичных генов в растениях земляники садовой в условиях открытого грунта. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу.

- Ограниченные полевые испытания (цель, задача)

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам.

- Испытания на биобезопасность

Оценка возможности спонтанного переноса чужеродных генов в растения нетрансгенных сортов.

3.1.2 Места проведения испытаний

Полигон для испытаний ГМО на базе Интродукционно-карантинного питомника Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

3.1.3 Планируемый период проведения эксперимента в поле (предполагаемые даты начала и завершения работ)

Предполагаемая дата начала работ - апрель-май, окончание работы - октябрь 2004 г.

3.1.4 Количество трансгенных растений/площадь посева

Не менее 10 растений на одну трансгенную линию.

3.1.5 Агрономические приемы, применяемые при выращивании трансгенных растений

При выращивании трансгенного растительного материала будут использоваться типовые агротехнические приемы, применяемые при промышленном возделывании данной культуры, а также проводиться оценка фенотипических проявлений перенесенного признака.

3.1.6 Методы удаления с поля трансгенного материала при экстренной необходимости

При возникновении экстренной ситуации предусматривается раскорчевка растений и полное уничтожение растительного материала

3.1.7 Схема посадки трансгенных растений и расположения на опытном экспериментальном участке (по согласованию заявителя с исполнителем полевых испытаний)

Система посадки трехрядная, расстояние между рядами 1 м, а между растениями в ряду 0,5 м. Ограниченная рандомизация по линиям.

4. Данные о взаимодействии трансгенного растения с окружающей средой

4.1. Свойства ГМР, влияющие на их выживание, неконтролируемое размножение

По причине практической невозможности семенного размножения садовой земляники и жестких мер предосторожности в карантинном питомнике, неконтролируемое размножение представляется маловероятным.

4.2. Взаимодействие ГМР с окружающей средой, флорой и фауной в месте выпуска

Испытуемые трансгенные растения не оказывают негативного влияния на флору и фауну, так как привнесенные гены не являются токсичными для представителей флоры и фауны в месте выпуска.

4.3. Вероятность передачи трансгенов другим организмам

Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях и возможности семенного размножения только в

искусственных условиях, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

5. Мониторинг и действия в чрезвычайных ситуациях

Полевые испытания предполагается проводить на изолированной территории огороженной металлической сеткой высотой 2,4 м. С внутренней стороны питомник окружен канавой глубиной 0,5-0,7 метра. Имеется один въезд, ворота с дезинфицирующим устройством. Оборудована санитарная яма для утилизации растительных остатков подлежащих уничтожению. Обеспечивается круглосуточная охрана территории. При возникновении экстренной ситуации предусматривается полное уничтожение растительного материала.


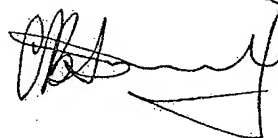
6. Информация о ГМР, предоставляемая для открытого доступа:

- Культура земляника садовая
- сорт (по усмотрению заявителя)
- трансформационное событие (номер)
- «новое свойство» - улучшенный вкус и повышенная устойчивость к фитопатогенам
- ген (по усмотрению заявителя)
- место выпуска (регион) - Европейская часть России
- цель полевых испытаний - изучение фенотипического проявления новых свойств в условиях открытого грунта
- год - 2004

Ответственные исполнители:

М.н.с. станции «Биотрон», ФИБХ РАН

Зав. станцией «Биотрон», ФИБХ РАН

 Шестибратов К.А.
 Долгов С.В.

Approved by

V.M. Lipkin, Deputy Director
FIBKh RAN

Signature
Stamp

Deed of Assignment/Acceptance
of genetically modified plants (GMP)

1. Registration no. and code of the assigned/accepted material

2. Information about the authors of GMP

2.1. Name, first name, patronymic. Position. Institution (name, affiliation). Address, telephone, fax.

K.A. Shestibratov, S.V. Dolgov. Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

3. Characterization of the assigned/accepted GMP

3.1. English name, Latin name of species and family. Varieties.

Garden strawberry (*Fragaria ananassa* D.), Feyerwerk variety (selection of All-Russian Research Institute of Genetics and Selection of Fruit Plants, VNIIG&SPR), Rosales family (*Rosacea*).

3.2. Information about transformation of the recipient.

- name of the transformed line: F-40-(I-I)-I; F-40-1:1,2,5,7-10,12-20; F-40-II-3; F-40-VII: 1, 2;

- category of the transformed ferature: FR, PQ;

- phenotype: FR, improved taste;

-genetic engineering construct (vector): pB1121thau;

-genotype:

promoter – 35S

gene – thaumatinII

enhancer –

terminator – nos

selectable markers:

promoter – nos

gene – NPTII

terminator – nos

4. Method of transformation: agrobacterial, CBE21 strain.

5. Information about previous tests of the assigned/accepted GMP

6. Anticipated consequences of an uncontrolled escape of GMP to the environment during the assignment. Assessment of the risk degree

There is a probability of cross-pollination with cultivated plants, however because of the use of fruit for consumer purposes, imparting the acquired features to wild plants does not seem possible.

7. Movement of the material

7.1. Source (sender)

S.V. Dolgov, Director of the Biotron Station

Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

7.2. Customer (addressee)

All-Russian Research Institute of Selection of fruit Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences)

7.3. Quantity of the assigned material and specific form thereof.

Seedlings at the age of 6 to 12 months. The list is enclosed.

7.4. The aim of assignment.

Testing the level of the phenotypic manifestation of the transferred gene on the taste properties and resistance of plants to phytopathogens. Assessment of correspondence of transgenic plants to the phenotypic features of the initial genotype. Assessment of the possibility of a spontaneous transfer of a foreign gene to allied species.

7.5. Place of anticipated introduction

- The introduction-quarantine botanical garden of the All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants (Orel City, p/o Zhilino).

- introduction scale

See Enclosure

8. I (we) confirm that the assignment/acceptance of the GMP material will be effectuated in compliance with the present document and will conform to legal conceptions and standards established by the Interdepartmental Commission on Problems of Genetic Engineering Activities (Commission).

The changes in paragraphs 1-7 will be agreed upon with the Commission before the assignment/acceptance of the GMP.

Sender _____ S.V. Dolgov

Date _____

Addressee _____ G.D. Ivanovskii

Date _____



директора ФИБХ РАН
В.М. Липкин

АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.
2. Данные об авторах ГМР.
 - 2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация (название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

К.А. Шестибратов, С.В. Долгов. Филиал Института биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 0277 9 05 27
3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.
 - 3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.

Название сорта (ов)
Земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.), сорт Фейерверк (селекция ВНИИГиСПР) из семейства Розоцветных (*Rosaceae*).
 - 3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.
 - наименование трансформированной линии: Ф-40-(I-1)-1; Ф-40-I:1, 2, 5, 7-10, 12-20; Ф-40-II-3; Ф-40-VII: 1, 2.
 - категория трансформированного признака: FR, PQ
 - фенотип: FR, улучшенный вкус
 - генно-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
 - генотип:
 - промотор - 35S
 - ген - *thaumatinII*
 - усилитель (enhancer) -
 - терминатор - nos
 - селектируемые маркеры:
 - промотор - nos
 - ген - NPTII
 - терминатор - nos
4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм СВЕ21
5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности.

Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель).

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.
Рассада в возрасте 6-12 месяцев. Список прилагается.

7.4. Цель передачи

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

-Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

- масштаб интродукции

- см. приложение

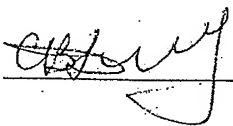
8. Я (мы) удостоверяю(ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).

Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

☐

☐

Подпись (и) отправителя (ей)



Фамилии

Долгов С.В.

☐

Дата

☐

☐

Подпись (и) получателя (ей)

Мамонтова

Фамилии

Мамонтова Т.С.

Дата

Approved by

V.M. Lipkin, Deputy Director

Signature

FIBKh RAN

Stamp

Deed of Assignment/Acceptance
of genetically modified plants (GMP)

1. Registration no. and code of the assigned/accepted material

32-P/00

2. Information about the authors of GMP

2.1. Name, first name, patronymic. Position. Institution (name, affiliation). Address, telephone, fax.

S.V. Dolgov, Director, Biotron Station. Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

3. Characterization of the assigned/accepted GMP

3.1. English name, Latin name of species and family. Varieties.

Cultivated apple (*Malus domestica*), Melba variety, Canadian selection, Rosales family (*Rosacea*).

3.2. Information about transformation of the recipient.

- name of the transformed line: MI 2-1,2-2
- category of the transformed ferature: FR, PQ;
- phenotype: FR, improved taste;
- genetic engineering construct (vector): pB1121thau;
- genotype:

promoter – 35S

gene – thaumatinII

enhancer –

terminator – nos

selectable markers:

promoter – nos

gene – NPTII

terminator – nos

4. Method of transformation: agrobacterial, CBE21 strain.

5. Information about previous tests of the assigned/accepted GMP

6. Anticipated consequences of an uncontrolled escape of GMP to the environment during the assignment. Assessment of the risk degree

There is a probability of cross-pollination with cultivated plants, however because of the use of fruit for consumer purposes and absence of reproduction by seeds, imparting the acquired features to wild plants does not seem possible.

7. Movement of the material

7.1. Source (sender)

S.V. Dolgov, Director of the Biotron Station

Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

7.2. Customer (addressee)

All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences

7.3. Quantity of the assigned material and specific form thereof.

One-year seedlings (the list is enclosed).

7.4. The aim of assignment.

Testing the level of the phenotypic manifestation of the transferred gene on the consumer taste properties and resistance of plants to phytopathogens. Assessment of correspondence of transgenic plants to the phenotypic features of the initial genotype. Assessment of the possibility of a spontaneous transfer of a foreign gene to allied species.

7.5. Place of anticipated introduction

- The introduction-quarantine botanical garden of the All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants (Orel City, p/o Zhilino).

- introduction scale

See Enclosure

8. I (we) confirm that the assignment/acceptance of the GMP material will be effectuated in compliance with the present document and will conform to legal conceptions and standards established by the Interdepartmental Commission on Problems of Genetic Engineering Activities (Commission).

The changes in paragraphs 1-7 will be agreed upon with the Commission before the assignment/acceptance of the GMP.

Sender _____ S.V. Dolgov

Date _____

Addressee _____ G.D. Ivanovskii



Зам. директора ИБХ РАН
Иван-корр. РАН В.М.Липкин

**АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)**

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.

32-Р/00

2. Данные об авторах ГМР.

2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация
(название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биорганической химии им. акад. М.М.Шемакина и
Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42,
факс 02779 05 27

3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.

3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.
Название сорта (ов)

Яблоня домашняя (*Malus domestica*) сорт Мелба канадской селекции семейство
Розоцветных (*Rosaceae*).

3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.

- наименование трансформированной линии: MI 2-1,2-2
- категория трансформированного признака: FR, PQ
- фенотип: FR, улучшенный вкус
- гено-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
- генотип:

 промотор - 35S

 ген - thaumatinII

 усилитель (enhancer) -

 терминатор - pos

 селектируемые маркеры:

 промотор - pos

 ген - NPTII

 терминатор - pos

4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм СВЕ21

5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого/
ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности. Возможно переопыление с культурными насаждениями, однако ввиду использования плодов в потребительских целях и отсутствия семенного размножения, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В. Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель).

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.

Однолетние саженцы (список прилагается)

7.4. Цель передачи

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

- Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г. Орел, п/о Жилино).

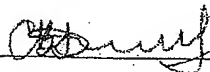
- масштаб интродукции

- см. приложение

8. Я (мы) удостоверяю(ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).

Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

Подпись (и) отправителя (ей)

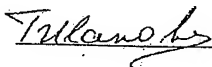


Фамилии

С.В. Долгов

Дата 31.05.00

Подпись (и) получателя (ей)



Фамилии

Т.Д. Ивановский

Дата

Approved by

V.M. Lipkin, Deputy Director

Signature

FIBKh RAN

Stamp

Deed of Assignment/Acceptance
of genetically modified plants (GMP)

1. Registration no. and code of the assigned/accepted material

33-P/00

2. Information about the authors of GMP

2.1. Name, first name, patronymic. Position. Institution (name, affiliation). Address, telephone, fax.

V.G. Lebedev, S.V. Dolgov, Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

3. Characterization of the assigned/accepted GMP

3.1. English name, Latin name of species and family. Varieties.

Common pear (*Pyrus communis* L.), Burakovka variety (Belorussian folk selection), Rosales family (*Rosacea*).

3.2. Information about transformation of the recipient.

- name of the transformed line: MI 2-1,2-2
- category of the transformed ferature: FR, PQ;
- phenotype: FR, improved taste;
- genetic engineering construct (vector): pB1121thau;
- genotype:

promoter – 35S

gene – thaumatinII

enhancer –

terminator – nos

selectable markers:

promoter – nos

gene – NPTII

terminator – nos

4. Method of transformation: agrobacterial, CBE21 strain.

5. Information about previous tests of the assigned/accepted GMP

6. Anticipated consequences of an uncontrolled escape of GMP to the environment during the assignment. Assessment of the risk degree

There is a probability of cross-pollination with cultivated plants, however because of the use of fruit for consumer purposes and absence of reproduction by seeds, imparting the acquired features to wild plants does not seem possible.

7. Movement of the material

7.1. Source (sender)

S.V. Dolgov, Director of the Biotron Station

Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. 142290 Pushchino, Moscow Region, tel. (095) 925 23 42; fax 0277 9 05 27.

7.2. Customer (addressee)

All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants, Russian Academy of Agricultural Sciences

7.3. Quantity of the assigned material and specific form thereof.

One-year seedlings (the list is enclosed).

7.4. The aim of assignment.

Testing the level of the phenotypic manifestation of the transferred gene on the consumer taste properties and resistance of plants to phytopathogens. Assessment of correspondence of transgenic plants to the phenotypic features of the initial genotype. Assessment of the possibility of a spontaneous transfer of a foreign gene to allied species.

7.5. Place of anticipated introduction

- The introduction-quarantine botanical garden of the All-Russian Research Institute of Selection of Fruit Plants (Orel City, p/o Zhilino).

- introduction scale

See Enclosure

8. I (we) confirm that the assignment/acceptance of the GMP material will be effectuated in compliance with the present document and will conform to legal conceptions and standards established by the Interdepartmental Commission on Problems of Genetic Engineering Activities (Commission).

The changes in paragraphs 1-7 will be agreed upon with the Commission before the assignment/acceptance of the GMP.

Sender _____ S.V. Dolgov

Date _____

Addressee _____ G.D. Ivanovskii



директора ФИБХ РАН
Зам. дир. ФИБХ РАН В.М.Липкин

АКТ НА ПЕРЕДАЧУ/ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ (ГМР)

1. Регистрационный номер и код передаваемого/получаемого материала.

33-Р/00

2. Данные об авторах ГМР.

2.1. Фамилия, имя, отчество. Должность. Организация
(название и принадлежность). Адрес, телефон, факс.

В.Г. Лебедев С.В. Долгов. Филиал Института биорганической химии им. акад.
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел
(095) 925 23 42, факс 02779 05 27

3. Характеристика передаваемого/получаемого ГМР.

3.1. Тривиальное название, латинское название вида и семейства.
Название сорта (ов)

Груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.) сорта Бураковка (белорусская народная
селекция) из семейства Розоцветных (*Rosacea*)

3.2. Основные сведения о трансформации реципиента.

- наименование трансформированной линии: MI 2-1,2-2
- категория трансформированного признака: FR, PQ
- фенотип: FR, улучшенный вкус
- генно-инженерная конструкция (вектор): pBI121thau
- генотип:

промотор - 35S

ген - thaumatinII

усилитель (enhancer) -

терминатор - nos

селектируемые маркеры:

промотор - nos

ген - NPTII

терминатор - nos

4. Метод трансформации: агробактериальный, штамм CBE21

5. Данные о всех предыдущих испытаниях передаваемого/получаемого/
ГМР.

6. Предполагаемые экологические последствия неконтролируемого выноса ГМР в окружающую среду в процессе передачи. Оценка степени их опасности. Возможно переопыление с культурными насаждениями; однако ввиду использования плодов в потребительских целях и отсутствия семенного размножения, передача приобретенных признаков дикорастущим растениям представляется маловероятной.

7. Движение материала.

7.1. Источник (отправитель)

С.В.Долгов, зав. Ст. Биотрон

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290 г. Пущино Московской области, тел (095) 925 23 42, факс 02779 05 27

7.2. Заказчик (получатель):

Всесоюзный Научно-исследовательский институт селекции плодовых культур РАСХН

7.3. Количество передаваемого материала и его конкретный вид.

Однолетние саженцы, список прилагается

7.4. Цель передачи

Проверка уровня фенотипического проявления перенесенного гена на потребительские качества плодов и устойчивость растений к фитопатогенам. Оценка соответствия трансгенных растений по фенотипическим признакам исходному генотипу. Оценка возможности спонтанного переноса чужеродного гена в родственные культуры.

7.5. Место предполагаемой интродукции.

- Интродукционно-карантинный питомник Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (г.Орел, п/о Жилино).

- масштаб интродукции

8. Я (мы) удостоверяю(ем), что передача/получение/ материала ГМР будут выполнены в соответствии с данным документом и будут отвечать правовым нормам и стандартам, разработанным Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД).

Все изменения пунктов 1-7 будут согласованы с Межведомственной Комиссией до передачи/получения/ ГМР.

Подпись (и) отправителя(ей) С.В.Долгов фамилии С.В.Долгов

Дата 31.05.00

Подпись (и) получателя(ей) Т.Д. Уваровский фамилии Т.Д. Уваровский

Дата _____

Approved by

V.M. Lipkin, Deputy Director
FIBKh RAN

Signature

Stamp

“ ” 2002

REPORT

on carrying out the field tests of transgenic plants: apple, pear, strawberry, and chrysanthemum produced at the Biotron station of artificial climate on the polygon of the Research Institute of Selection of Fruit Plants in 2002

During 2002 there were carried out the field tests of the following plant species:

(a) Cultivated apple (*Malus domestica*)

- clonal stock N 545 with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 34-P/00)

- Melba variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 32-P/00)

- clonal stock N 545 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 30-P/00)

- Melba variety, stock N 545 with a reporter *gusA* gene and a selective *nptII* gene (reg. no.)

(b) Common pear (*Pyrus communis* L.):

- Burakovka variety with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 35-P/00)

- Burakovka variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 33-P/00)

- clonal stock GP N 217 with a reporter *gusA* gene and selective *nptII* or *hpt* genes (reg. no.)

- clonal stock GP N 217 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 31-P/00)

(c) Garden strawberry (*Fragaria ananassa* D.)

- Feyerwerk variety with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 42-P/00)

- Feyerwerk variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no.)

(d) Garden chrysanthemum (*Dendratherema morifolium* Ramat)

- White Snowdon variety with a *rolC* gene of modifying of product quality and a selective *nptII* gene (reg. no.)

During 2002 there were carried out the following tests of the transgenic plants.

1. An analysis of transgenic plants for possible variations of their morphological parameters from control nontransgenic plants

The field tests of 18 lines of strawberry with a *thaumatinII* gene for compliance with the variety type showed that only 11 lines conform to the Feyerwerk variety in their basic vegetative and generative activity. Seven lines differed from control plants in a number of parameters, namely, the bush height, number of flower stalks, crop yield, and fruit form. No variations from control plants were detected for strawberry clones with a radish dephenzine gene and for transgenic clones of apple and pear. Transgenic chrysanthemum plants with a *rolC* gene were characterized by a number of phenotypic changes that are specific for expression of an introduced gene of modification of habitus, namely, reduced growth, shortened internodes, and increased dissection of leaf blade.

2. Assessment of expression of a supersweet protein.

The functionality of an introduced *thaumatinII* gene of a supersweet protein in transgenic apple, pear, and strawberry plants was analyzed using a Western blot hybridization technique. An analysis was performed for strawberry leaves and berries and apple and pear leaves. It was found that the protein is synthesized in 15 out of 18 strawberry lines containing the foreign gene and in all of 2 apple lines and 3 pear lines.

3. Assessment of resistance to herbicide of transgenic apple and pear plants.

Resistance of the apple and pear clonal stocks containing a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine bar was assessed by means of treatment of the plants with an aqueous solution of a Basta herbicide. The plants were sprinkled with a 1% solution of the herbicide at a dose equivalent to 20 l/hectare for pear plants and 10 and 20 l/hectare for apple plants. The standard field dose is 3 to 5 l/hectare. It was found that the transgenic plants exhibit a high resistance to the herbicide treatment.

4. Assessment of the possibility of a vertical transfer of a foreign gene to nontransgenic wild plants of allied species.

Investigation of the possibility of cross-pollination of transgenic plants with wild relatives (common strawberry *Fragaria vesca*) with pollen of transgenic *Fragaria ananassa* plants containing an nptII gene showed that the cultivation of transgenic and nontransgenic plants in the immediate proximity to each other (0.5 to 1 m) under a common protecting canopy that prevents

the pollen propagation results in cross-pollination. The frequency of cross-pollination on conversion to berries varied from 25 to 75%.

At the end of the vegetative season of 2002, transgenic plants containing a gene of vegetable dephenzine (86 apple plants and 167 pear plants) were grubbed out and destroyed in compliance with the safety rules pertaining to the work with transgenic biological material.

Responsible executive:

S.V. Dolgov, Director
Biotron Station, FIBKh RAN

«УТВЕРЖДАЮ»



Зам. директора ИБХ РАН

В.М. Липкин

В.М. Липкин

2002 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши, земляники и хризантемы, полученных на станции искусственного климата «Биотрон», на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2002 году

В течение 2002 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- клонировый подвой № 545 с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 34-P/00)
- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 32-P/00)
- клонировый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00)
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. №)

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 35-P/00)
- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 33-P/00)
- клонировый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptII* или *hpt* (рег. №)
- клонировый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00)

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.)

- сорт Фейерверк с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 42-P/00)
- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. №)

г) хризантема садовая (*Dendrathera morifolium* Ramat)

- сорт White Snowdon с геном изменения качества продукции *rolC* и селективным геном *nptII* (рег. №)

В течение 2002 года проводились следующие испытания трансгенных растений:

1. Анализ трансгенных растений на предмет возможных отклонений по своим морфологическим параметрам от контрольных нетрансгенных растений.

Полевые испытания 18 линий земляники с геном *thaumatinII* на предмет соответствия сортовику показали, что только 11 линий по основным показателям вегетативной и генеративной активностей соответствуют сорту Фейерверк. 7 линий по ряду показателей, а именно: высоте куста, количеству цветоносов, урожайности и форме плодов, отличались от контрольных растений. Не было выявлено отклонений от контрольных растений для клонов земляники с геном редечного дефензина, а также для трансгенных клонов яблони и груши. Трансгенные растения хризантемы с геном *rolC* характеризовались проявлением ряда фенотипических изменений, типичных для экспрессии встроенного гена изменения габитуса, а именно: редуцированным ростом, укороченными междоузлиями и повышенной рассеченностью листовой пластинки.

2. Оценка экспрессии суперсладкого белка.

Функциональность интродуцированного гена суперсладкого белка *thaumatin II* в трансгенных растениях яблони, груши и земляники анализировалась методом Вестерн-блот гибридизации. Анализу подвергались листья и плоды земляники, а также листья яблони и груши. Было установлено, что белок синтезируется в 15 из 18 линий земляники, содержащих чужеродный ген, а также во всех 2 линиях яблони и 3 линиях груши.

3. Оценка устойчивости к гербициду трансгенных растений яблони и груши.

Устойчивость клоновых подвоев яблони и груши, содержащих ген устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar*, была оценена обработкой этих растений водным раствором гербицида "Basta". Опрыскивание проводили 1% раствором гербицида в дозе, эквивалентной 20 л/га для растений груши и 10 и 20 л/га для растений яблони. Стандартная

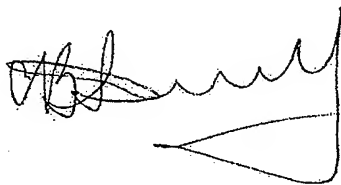
Полевая доза составляет 3-5 л/га. Было установлено, что трансгенные растения обладают высокой степенью устойчивости к обработке гербицидом.

4. Оценка возможности вертикального переноса чужеродного гена в нетрансгенные дикорастущие растения близкородственных видов.

Изучение возможности перекрестного опыления трансгенных растений с дикими сородичами (земляники лесной *Fragaria vesca*) пылью трансгенных растений *Fragaria ananassa*, содержащих ген *prtII*, показало, что при культивировании трансгенных и нетрансгенных растений в непосредственной близости друг от друга (0,5 -1 м) под общим защитным пологом, предотвращающим распространение пыльцы, переопыление происходит. Частота переопыления, при пересчете на ягоды варьировала от 25 до 75 %.

По окончании вегетационного сезона 2002 года насаждения трансгенных растений с геном растительного дефензина в количестве 86 растений яблони и 167 растений груши были заскорчеваны и утилизированы с соблюдением всех норм безопасности по работе с трансгенным биологическим материалом.

Ответственный исполнитель
зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.



С.В.Долгов

Approved by

S.A. Feofanov, Deputy Director

Signature

FIBKh RAN

Stamp

“___” _____ 2003

REPORT

on carrying out the field tests of transgenic plants: apple, pear, and strawberry produced at the Biotron station of artificial climate on the polygon of the Research Institute of Selection of Fruit Plants in 2002

During 2003 there were carried out the field tests of the following plant species:

(a) Cultivated apple (*Malus domestica*)

- Melba variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 32-P/00)

- clonal stock N 545 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 30-P/00)

- Melba variety, stock N 545 with a reporter *gusA* gene and a selective *nptII* gene (reg. no. 47-P/00)

(b) Common pear (*Pyrus communis* L.):

- Burakovka variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 33-P/00)

- clonal stock GP N 217 with a reporter *gusA* gene and selective *nptII* or *hpt* genes (reg. no. 48-P/00)

- clonal stock GP N 217 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 31-P/00)

(c) Garden strawberry (*Fragaria ananassa* D.)

- Feyerwerk variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 45-P/00)
- Feyerwerk variety with a reporter *gusA* gene and a selective *nptII* gene (reg. no.

During 2003 there were carried out the following tests of the transgenic plants.

1. An analysis of transgenic plants for possible variations of their morphological parameters from control nontransgenic plants

Eleven lines selected upon results of the field tests carried out in 2002 were analyzed anew for compliance with the initial variety type but after one stolonation. Among these lines, two lines had insignificant variations in the fruit morphology, namely, in the form and color. Upon the tests results, out of 18 lines accepted for testing, 9 lines had no variations in the phenotype.

For the transgenic clones, no variations from the control plants were detected.

2. Assessment of the expression of a *gusA* reporter gene

A quantitative analysis of expression of a *gusA* reporter gene was carried out with a fluorometric technique. The analysis of the leaf tissues was performed for 19 transgenic lines of a pear stock. The analysis showed a three-fold increase in the enzyme activity in plants containing a construct of the gene with intron.

3. Assessment of the expression of a supersweet protein

The functionality of an introduced *thaumatinII* gene of a supersweet protein in transgenic apple, pear, and strawberry plants was analyzed using a Western blot hybridization technique.

The analysis was performed for strawberry fruit of plants after one vegetative stolonation and for apple and fruit leaves. In 11 lines out of the selected strawberry lines without somaclonal variations, the thaumatin expression remained unchanged; the effect points to stable functioning of the thaumatin gene. Similar data were obtained upon an analysis of the thaumatin expression in all two apple lines and 3 pear lines.

4. Assessment of the possibility of a vertical transfer of a foreign gene to nontransgenic wild plants of allied species

An analysis of seeds from the fruit of common strawberry *Fragaria vesca* cultivated under a common protecting canopy with transgenic garden strawberry plants containing *thauII* and *gusA* genes showed that the frequency of cross-pollination on conversion to berries varied from 25 to 75% as is the case with an *nptII* gene. The plants of the wild relative that were growing in close proximity to the transgenic plants had not undergone cross-pollination.

Responsible executive:

S.V. Dolgov, Director
Biotron Station, FIBKh RAN

«УТВЕРЖДАЮ»

директора ФИБХ РАН



С.А.Феофанов

» _____ 2003 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши и земляники, полученных на станции искусственного климата «Биотрон», на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2003 году

В течение 2003 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 32-P/00)
- клоновый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00)
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. № 47-P/00)

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 33-P/00)
- клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptII* или *hpt* (рег. № 48-P/00)
- клоновый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00)

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.) //

- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. № 45-P/00)
- сорт Фейерверк с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. №

В течение 2003 года проводились следующие испытания трансгенных растений:

1. Анализ трансгенных растений на предмет возможных отклонений по своим морфологическим параметрам от контрольных нетрансгенных растений.

11 линий отобранных по результатам полевых испытаний 2002 года, повторно анализировались на предмет соответствия исходному сорто типу, но уже после одного акта вегетативного размножения усами. Среди них было обнаружено две линии с незначительными отклонениями в морфологии плодов, а именно форме и окраске. По результатам данных испытаний из 18 линий, допущенных к испытаниям, выделено 9 без отклонений в фенотипе.

Не было выявлено отклонений от контрольных растений для трансгенных клонов яблони и груши.

2. Оценка экспрессии репортерного гена *gusA*.

Количественный анализ экспрессии гена *gusA* проводили флуориметрическим методом. Анализировали листовую ткань 19 трансгенных линий подвоя груши. Анализ показал трехкратное превышение активности фермента в растениях, содержащих конструкцию гена с интроном.

3. Оценка экспрессии суперсладкого белка.

Функциональность интродуцированного гена суперсладкого белка *thaumatin II* в трансгенных растениях яблони, груши и земляники анализировалась методом Вестерн-блот гибридизации. Анализу подвергались плоды земляники с растений претерпевших один акт вегетативного размножения усами, а также листья яблони и груши. У 11 отобранных линий земляники без соматоклональных изменений, картина экспрессии тауматина осталась без изменений, что уже позволяет говорить о стабильном функционировании гена тауматина. Аналогичные данные получены при анализе экспрессии тауматина во всех 2 линиях яблони и 3 линиях груши.

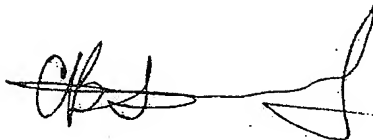
4. Оценка возможности вертикального переноса чужеродного гена в нетрансгенные дикорастущие растения близкородственных видов.

Анализ семян из плодов земляники лесной *Fragaria vesca*, культивируемой под общим защитным пологом с трансгенными растениями земляники садовой содержащими гены *thauII* и *gusA*, показал, что частота переопыления при пересчете на ягоды варьировала от 25

до 75 %, как и в случае с геном prtII. Растения дикого родича, растущие вне защитного полога, но в непосредственной близости от трансгенных растений не претерпели переопыления.

Ответственный исполнитель

зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.



С.В.Долгов

Approved by

S.A. Feofanov, Deputy Director *Signature*FIBKh RAN *Stamp*

“ ____ ” ____ 2001

REPORT

on carrying out the field tests of transgenic plants: apple, pear, and strawberry produced at the Biotron station of artificial climate on the polygon of the Research Institute of Selection of Fruit Plants in 2002

During 2000 there were carried out the field tests of the following plant species:

(a) Cultivated apple (*Malus domestica*)

- clonal stock N 545 with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 34-P/00); 26 clones, 89 pcs.

- Melba variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 32-P/00); 2 clones, 21 pcs.

- clonal stock N 545 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 30-P/00); 1 clone, 8 pcs.

- Melba variety, stock N 545 with a reporter *gusA* gene and a selective *nptII* gene (reg. no.); 12 clones, 12 pcs.

- clonal stock N 545 nontransformed; 12 pcs.

(b) Common pear (*Pyrus communis* L.):

- Burakovka variety with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 35-P/00); 65 clones, 167 pcs.

- Burakovka variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no. 33-P/00); 4 clones, 25 pcs.

- clonal stock GP N 217 with a reporter *gusA* gene and selective *nptII* or *hpt* genes (reg. no.); 19 clones, 49 pcs.

- clonal stock GP N 217 with a gene of resistance to herbicides based on phosphinotricine *bar* and a selective *nptII* gene (reg. no. 31-P/00); 17 clones

- Burakovka variety nontransformed; 5 pcs.

- clonal stock GP N 217 nontransformed; 6 pcs.

(c) Garden strawberry (*Fragaria ananassa* D.)

- Feyerwerk variety with an Rs-AFP2 gene of radish dephenzine and a selective *nptII* gene (reg. no. 42-P/00); 6 clones, 43 pcs.

- Feyerwerk variety with a *thaumatinII* gene of supersweet protein and a selective *nptII* gene (reg. no.); 20 clones, 154 pcs.

- Feyerwerk variety nontransformed; 10 pcs.

(d) Garden chrysanthemum (*Dendratherma morifolium* Ramat)

- White Snowdon variety with a *rolC* gene of modifying of product quality and a selective *nptII* gene (reg. no.); 1 clone

Apple plants were one, two-, and three-year seedlings; pear plants, one- and two-year seedlings; strawberry plants, one-year seedlings; chrysanthemum, rooted green cuttings.

There was carried out assessment of morphological properties of the transgenic plants. No variations from the control plants were detected.

There was carried out appraisal of the planted seedlings for compliance with the variety features.

Also, there were carried out histochemical and fluorometric analyses of the leaf tissues for expression of the *gusA* gene.

An organoleptic analysis of the leaf tissues of plants with a gene of supersweet protein was carried out.

At the end of the vegetative season, the following quantitative parameters were measured: the plant height, trunk diameter, branches quantity and length.

At the end of the vegetative season, there were taken samples of soil at a different depth in order to assess the probability of a horizontal transfer of foreign genes from the genetically modified plants to the soil microflora.

There was performed a vegetative reproduction of transgenic and control strawberry plants by sprouts.

Responsible executive:

S.V. Dolgov, Director

Biotron Station, FIBKh RAN

«УТВЕРЖДАЮ»



Зам. директора ИБХ РАН

Член-кор. РАН

В.М.Липкин

» _____ 2001 года

ОТЧЕТ

о проведении полевых испытаний трансгенных растений яблони, груши и земляники, полученных на станциях искусственного климата «Биотрон» на полигоне при ВНИИ селекции плодовых культур в 2000 году

В течение 2000 года проводились полевые испытания следующих видов растений:

а) яблоня домашняя (*Malus domestica*)

- клоновый подвой № 545 с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 34-P/00), 26 клонов – 89 шт
- сорт Мелба с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptIII* (рег. № 32-P/00), 2 клона – 21 шт
- клоновый подвой № 545 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 30-P/00), 1 клон – 8 шт
- сорт Мелба, подвой № 545 с репортерным геном *gusA* и селективным геном *nptII* (рег. № _____), 12 клонов – 12 шт
- клоновый подвой № 545 нетрансформированный – 12 шт

б) груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.):

- сорт Бураковка с геном редечного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 35-P/00), 65 клонов – 167 шт
- сорт Бураковка с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptIII* (рег. № 33-P/00), 4 клона – 25 шт
- клоновый подвой ГП № 217 с репортерным геном *gusA* и селективными генами *nptIII* или *hpt* (рег. № _____), 19 клонов – 49 шт
- клоновый подвой ГП № 217 с геном устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина *bar* и селективным геном *nptII* (рег. № 31-P/00), 17 клонов

- сорт Бураковка нетрансформированный – 5 шт
- клоновый подвой ГП № 217 нетрансформированный – 6 шт

в) земляника садовая (*Fragaria ananassa* D.)

- сорт Фейерверк с геном речного дефензина Rs-AFP2 и селективным геном *nptII* (рег. № 42-P/00), 6 клонов – 43 шт
- сорт Фейерверк с геном суперсладкого белка *thaumatinII* и селективным геном *nptII* (рег. №), 20 клонов – 154 шт
- сорт Фейерверк нетрансформированный – 10 шт

г) хризантема садовая (*Dendrathera morifolium* Ramat)

- сорт White Snowdon с геном изменения качества продукции *rolC* и селективным геном *nptII* (рег. №), 1 клон – шт

Посадка яблони проведена одно-, дву- и трехлетними саженцами, груши – одно- и двухлетними саженцами, земляники – однолетними растениями, хризантемы – укорененными зелеными черенками.

Проведена оценка морфологических свойств трансгенных растений. Отклонений от контрольных растений не выявлено.

Проведена апробация высаженных растений на предмет соответствия сортовым признакам.

Также был проведен гистохимический и флуориметрический анализ листовой ткани на экспрессию гена *gusA*.

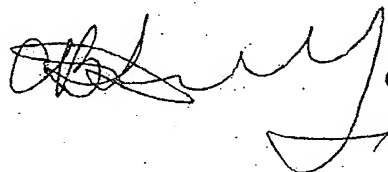
Проводили органолептический анализ листовой ткани растений с геном суперсладкого белка.

После окончания вегетационного сезона провели измерения количественных параметров: высоты растений, диаметра штамба, количества и длины ветвей.

В конце сезона произведен отбор проб почвы с различной глубины с целью определения возможности горизонтального переноса чужеродных генов из генетически модифицированных растений в почвенную микрофлору.

Также осуществлено вегетативное размножение трансгенных и контрольных растений земляники с помощью розеток.

Ответственный исполнитель
зав. станцией «Биотрон», к.с.-х.н.

 С.В. Долгов

REFERENCES PERTAINING TO THE INVENTION

1. Shestibratov K.A., Taran S.A., Lunin V.G., Shmatchenko V.V., Piskareva O.A., Dolgov S.V. (2000), Molecular selection of garden strawberry for enhancement of resistance to phytopathogens and improvement of fruit taste by introduction of RS-AFP2 plant dephenzine genes and thaumatinII supersweet protein/ in Abstracts of the 5th Conference in memory of Academician Yu. A. Ovchinnikov/ Bioorganika, 13-20 November 2000, IBKh-FIBKh, Moscow-Pushchino.
2. Lebedev V.G., Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2001), Efficiency of co-integration of heterological DNA sequences from T-regions of different agrobacterial replicons into the nuclear genome of plants/ in Abstracts of the FIBKh,Conference, 22-23 November 2001, Pushchino.
3. Dolgov S.V., Lebedev V.G., Shestibratov K.A., Mityushkina T.Yu. (2002)/ Field tests of transgenic garden plants: Problems and Prospects/ in Abstracts of the 6th Conference in memory of Academician Yu. A. Ovchinnikov/ Bioorganika, 25 november- 2 December 2002, IBKh-FIBKh, Moscow-Pushchino.
4. Lebedev V.G., Shestibratov K.A., Mityushkina T.Yu., Dolgov S.V. (2002), Field tests of transgenic fruit and berry plants (in Bulletin of the Interdepartmental Commission on Problems of Genetic Engineering Activities, no. 3, 2002.
5. Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2005), Method of producing transgenic plants exhibiting improved resistance to phytopathogens/ RF patent N 2261275, priority as from 24 October 2002.
6. Shestibratov K.A., Korneeva I.V., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. (2005), Expression of heterological PR-5 proteins and enhancement of resistance of plants to phytopathogens./ in Abstracts of the 3rd Moscow International Congress "Biotechnology: Status and Prospects, Moscow, Russia, 14-16 March 2005.

7. Pushin A.S., Shestibratov K.A., Bulatova I.V., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2005), Improvement of resistance of plants to pathogens via heterologous expression of native and modified pr-5 genes.// in Proceedings of the 2nd International Conference “Science, business, education, biotechnology, biomedicine, environment”, Puschchino, 11-13 May 2005.
8. Pushin A.S., Shestibratov K.A., Ovchinnikova E.V., Bulatova I.V., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2005), Family of genes of thaumatin-like proteins as a promising group in improvement of resistance of plants to pathogens via plant transgenesis./ in Proceedings of the 6th International Conference “Molecular genetics of somatic cells”//Zvenigorod, 12-16 December 2005. Puschchino, 11-13 May 2005.
9. Lebedev V.G., Shestibratov K.A., Mikhailov R.V., Ivanovskii G.D., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. (2005) Genetic engineering methods in selection of fruit and berry plants. Collection of works “Fruit and berries cultivation in Russia”, Moscow, VSTISP, 2005, vol. 12, pp. 348-357.
10. Pushin A.S., Shestibratov K.A., Ovchinnikova E.V., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2006), Accumulation of recombinant thaumatinII supersweet protein in apoplast of transgenic tobacco plants/ in Proceedings of the 3rd International Conference “Science and business: International cooperation in biotechnology: Expectations and reality”, 19-21 June 2006.
11. Shestibratov K.A., Lebedev V.G., Miroshnikov A.I. (2008), Forestry biotechnology: methods, technologies, prospects. Biotechnology, no. 5, pp. 3-22.
12. Timerbaev V.R., Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2008), Cloning and functional analysis of three forms of promoter of tomato polygalacturonase. Biotechnology, no. 6, pp. 23-30.
13. Shestibratov K.A., Bulatova I.V., Novikov P.S. (2009), Reaction of transgenic aspen plants with a glutamyl synthetase GS1 gene for a sublethal dose of phosphinotricine under in vitro conditions. Biotechnology, no. 6, pp. 49-56.
14. Lebedev V.G., Shestibratov K.A.*, Shadrina T.E., Bulatova I.V., Abramochkin D.G., Miroshnikov A.I. (2010) Co-transformation of aspen and birch with three t-DNA regions in two different replicons in one Agrobacterium tumefaciens strain, Genetics, no. 10 (in press).

15. Dolgov S.V., Miroshnichenko D.N., Shestibratov K.A. (2000) Agrobacterial transformation of apple cultivar and rootstock. *Acta Horticulturae*, N 538, V 2, pp 619-625.
16. Schestibratov K, Lebedev V.G., and Dolgov S (2001) Different effects of intron on gus expression in dicot and conifer woody plants. / in Abstracts of The International scientific congress "Tree biotechnology: in the next Millennium" Stevenson, Washington, July 22-27, 2001.
17. Schestibratov K and Dolgov S (2001) Genetic engineering of strawberry cv. Firework. / in Abstracts of 43rd ETCS Congress, Granada, Spain, September 30-October 3, 2001.
18. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of thaum and rs-afp3 genes. / in Abstracts of Agricultural Biotechnology International Conference, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 15-18 September, 2002.
19. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of thaum and rs-afp3 genes. / in Abstracts of 1st EPSO Conference: Networks in Plant Biology, Brunnen, Switzerland, 27-31 October, 2002.
20. Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci. Hort.* V 106(2): 177-189.
21. Korneeva L., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and cell localization of a PR-5 protein with different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants. *Revue de Cytologie et Biologie Vegetales* 28: 260-267. j
22. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and inheritance of transgenes in tomato plants transformed by a plant PR-5 protein gene. *ESNA XXXV Annual Meeting. Abstracts.* - Amiens, 29 August-2 September 2005.

23. Schestibratov, K.A., Dolgov, S.V. 2006. Genetic engineering of strawberry cv. Firework and cv. Selekt-a-for taste improvement and enhanced disease resistance by introduction of *thauii* gene. Acta Hort. (ISHS) 708:475-482.
24. Schestibratov K.A., Pushin A.S., Ovchinnikova E.V., Chang A., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2006) Apoplastic expression of the chimeric gene encoding the recombinant precursor of thaumatin II protein in transgenic tobacco plants. Abstracts of 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2006 Sustainable disease management: the European perspective. Frederiksberg, Denmark, August 13-17, 2006.
25. Schestibratov KA, Pushin AS, Bulatova IV, Firsov AP, Dolgov SV (2006) Thaumatin-like proteins: antifungal activity, heterologous expression and transgenic plant production. Abstracts of Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance Symposium in memoriam Zoltan Klement (1926-2005), Budapest, Hungary, August 31 - September 3, 2006.

T.A. Сапего (тел. 170)

Список публикаций авторов по теме изобретения

1. Шестибратов К.А., Таран С.А., Лунин В.Г., Шматченко В.В., Пискарева О.А., Долгов С.В. (2000). Молекулярная селекция земляники садовой на повышение устойчивости к фитопатогенам и изменение вкуса плодов путем интродукции генов растительного дефензина RS-AFP2 и суперсладкого белка тауматин II. / Тезисы докладов V чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова "Биоорганика", 13-20 ноября 2000, ИБХ-ФИБХ, Москва-Пушино.
2. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Долгов С.В. (2001) Эффективность коинтеграции гетерологичных последовательностей ДНК из Т-областей различных агробактериальных репликонов в ядерный геном растений. / Тезисы докладов Отчетной конференции Филиала Института биоорганической химии РАН, 22-23 ноября 2001 года, Пушино.
3. Долгов С.В., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Митюшкина Т.Ю. (2002) Полевые испытания трансгенных садовых культур: проблемы и перспективы. / Тезисы докладов VI чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова, 25 ноября – 2 декабря 2002, ИБХ-ФИБХ, Москва-Пушино.
4. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. (2002) Полевые испытания трансгенных плодовых и ягодных культур. / Информационный бюллетень Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности, N 3, 2002.
5. Шестибратов К.А., Долгов С.В. (2005) Способ получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенам. / Патент РФ N 2261275, приоритет от 24 октября 2002 г.
6. Шестибратов К.А., Корнеева И.В., Харченко П.Н., Долгов С.В. (2005) Экспрессия гетерологичных PR-5 белков и повышение устойчивости растений к фитопатогенам. Тезисы докладов Третьего Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 14-16 Марта, 2005.
7. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Булатова И.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2005) Повышение устойчивости растений к патогенам путем гетерологичной экспрессии нативных и модифицированных pr-5 генов. // Материалы 2-й международной конференции «Наука – Бизнес – Образование, Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда», Пушино, 11-13 мая 2005.
8. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Овчинникова Е.В., Булатова И.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2005) Семейство генов тауматин-подобных белков – как перспективная группа в повышении устойчивости растений к фитопатогенам путем растительного трансгеноза. Материалы VI

- Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток», Звенигород, 12-16 декабря 2005.
9. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Михайлов Р.В., Ивановский Г.Д., Харченко П.Н., Долгов С.В. (2005) Генно-инженерные методы в селекции плодовых и ягодных культур. Сборник научных трудов «Плодоводство и ягодоводство России». – Москва: Изд-во ВСТИСП, 2005. – Т.ХП. – С.348-357.
 10. Пушин А.С., Шестибратов К.А., Овчинникова Е.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. (2006) Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка thaumatin II в апопласте трансгенных растений табака. Материалы Третьей международной конференции из серии "Наука и бизнес": Международное сотрудничество в биотехнологии: Ожидания и реальность. 19 - 21 июня 2006 г., Пушкино.
 11. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. (2008) Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы. Биотехнология. № 5, С.3-22.
 12. Тимербаев В.Р., Шестибратов К.А., С.В.Долгов (2008) Клонирование и функциональный анализ трех форм промотора полигалактуроназы томата. Биотехнология. № 6, С.23-30.
 13. Шестибратов К.А., Булатова И.В., Новиков П.С. (2009) Реакция трансгенных растений осины с геном глутаминсинтетазы GS1 на сублетальную дозу фосфинотрицина в условиях *in vitro*. Биотехнология, № 6, С 49-56.
 14. В.Г.Лебедев, К.А.Шестибратов*, Т.Е.Шадрина, И.В.Булатова, Д.Г.Абрамочкин, А.И.Мирошников (2010) Ко-трансформация осины и березы тремя областями т-днк, находящимися на двух различных репликонах в одном штамме *Agrobacterium tumefaciens*. Генетика, № 10 (in press).
 15. Dolgov S.V., Miroshnichenko D.N., Shestibratov K.A. (2000) Agrobacterial transformation of apple cultivar and rootstock. *Acta Horticulturae*, N 538, V 2, pp 619-625.
 16. Schestibratov K, Lebedev V and Dolgov S (2001) Different effects of intron on gus expression in dicot and conifer woody plants. / in Abstracts of The International scientific congress "Tree biotechnology: in the next Millennium" Stevenson, Washington, July 22-27, 2001.
 17. Schestibratov K and Dolgov S (2001) Genetic engineering of strawberry cv. Firework. / in Abstracts of 43rd ETCS Congress, Granada, Spain, September 30-October 3, 2001.
 18. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of *thauII* and *rs-afp3* genes./ in Abstracts of Agricultural Biotechnology International Conference, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 15-18 September, 2002.
 19. Schestibratov K and Dolgov S (2002) Molecular breeding of strawberry cv Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of *thauII* and *rs-afp3* genes. / in Abstracts of 1st EPSO Conference: Networks in Plant Biology, Brunnen, Switzerland, 27-31 October, 2002.

20. Shestibratov K.A., Dolgov S.V. (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci. Hort.* V 106(2): 177-189.
21. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and cell localization of a PR-5 protein with different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants. *Revue de Cytologie et Biologie Végétales* 28: 260-267.
22. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. (2005) Expression and inheritance of transgenes in tomato plants transformed by a plant PR-5 protein gene. ESNA XXXV Annual Meeting. Abstracts. – Amiens, 29 August-2 September 2005.
23. Schestibratov, K.A., Dolgov, S.V. 2006. Genetic engineering of strawberry cv. Firework and cv. Selekt for taste improvement and enhanced disease resistance by introduction of *thaii* gene. *Acta Hort.* (ISHS) 708:475-482.
24. Schestibratov K.A., Pushin A.S., Ovchinnikova E.V., Chang A., Shulga O.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. (2006) Apoplastic expression of the chimeric gene encoding the recombinant precursor of thaumatin II protein in transgenic tobacco plants. Abstracts of 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2006 Sustainable disease management: the European perspective. Frederiksberg, Denmark, August 13-17, 2006.
25. Schestibratov KA, Pushin AS, Bulatova IV, Firsov AP, Dolgov SV (2006) Thaumatin-like proteins: antifungal activity, heterologous expression and transgenic plant production. Abstracts of Non-specific and Specific Innate and Acquired Plant Resistance Symposium in memoriam Zoltán Klement (1926-2005), Budapest, Hungary, August 31 – September 3, 2006.